Aus dem C. und O. Vogt - Institut für Hirnforschung
der Universität Düsseldorf
Direktor: Professor Dr. A. Hopf

ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG ZELLFREIER PROTEINSYNTHETISIERENDER SYSTEME AUS SKELETTMUSKELGEWEBE

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

JUTTA MEWALD

1981

1982

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535714_0096

Aus dem C. und O. Vogt - Institut für Hirnforschung
der Universität Düsseldorf
Direktor: Professor Dr. A. Hopf

Isolierung und Charakterisierung zellfreier proteinsynthetisierender Systeme aus Skelettmuskelgewebe

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin.
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

J u t t a M e w a l d

1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan.
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf
gez.: Prof.Dr. Straßburg

Referent.
gez.: Prof.Dr. Hopf
Koreferent
gez.: Prof.Dr. Kröner

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	4
1.1.	Anwendungsbereich der in vitro-Untersuchungsmethoden der Proteinsynthese	4
1.2.	Problemstellung	5
2.	Materialien und Methoden	6
2.1.	Versuchstiere	6
2.2.	Substanzen und Geräte	7
2.2.1.	Substanzen	7
2.2.2.	Geräte	8
2.3.	Präparationsmethoden	9
2.3.1.	Pufferlösungen	9
2.3.2.	Polysomen und Ribosomen	10
2.3.2.1.	Präparation der RNP-Fraktion	10
2.3.2.2.	Auftrennung von Polysomen und Ribosomen	14
2.3.3.	t-RNS	14
2.3.4.	Enzyme	17
2.3.5.	Postmitochondriale Überstandsfraktion	20
2.3.6.	Bestimmung des Gehalts an extrahierbaren Ribosomen, Polysomen, t-RNS und Enzymen	20
2.4.	Standardsysteme der zellfreien Proteinsynthese	21
2.4.1.	Polysomale Systeme	21
2.4.2.	Ribosomale Systeme	22
2.4.3.	Standardsysteme zur Aminoazylierung der t-RNS	23
2.4.4.	Systeme mit postmitochondrialer Überstandsfraktion (S-12)	23
2.4.5.	Entnahme und Weiterbehandlung der Proben	24

3. Ergebnisse 25

3.1. Präparation von RNP-Fraktion und t-RNS 25

3.1.1. RNP-Fraktion 26

3.1.2. t-RNS 27

3.2. Standardsysteme der zellfreien Proteinsynthese 31

3.2.1. Polysomale Systeme 32

3.2.2. Ribosomale Systeme 35

3.2.3. Standardsysteme zur Aminoazylierung der t-RNS 38

3.2.4. Systeme mit postmitochondrialer Überstandsfraktion 42

3.2.5. Untersuchung verschiedener Enzymfraktionen 44

4. Diskussion 45

4.1. Präparation von RNP-Fraktion und t-RNS 45

4.1.1. RNP-Fraktion 46

4.1.2. t-RNS 49

4.2. Standardsysteme der zellfreien Proteinsynthese 51

4.2.1. Polysomale Systeme 53

4.2.2. Ribosomale Systeme 55

4.2.3. Standardsysteme zur Aminoazylierung der t-RNS 56

4.2.4. Systeme mit postmitochondrialer Überstandsfraktion 58

4.2.5. Enzyme 60

5. Zusammenfassung 61

Anhang A Ablauf der Proteinsynthese in Eukaryonten 62

6. Literatur 65

Verzeichnis der Abkürzungen

A_{260}	diejenige Menge an Ribonukleinsäure, deren Absorption bei 260 nm Wellenlänge und einer Schichtdicke von 1 cm, multipliziert mit dem Volumen der Lösung, den Wert 1.0 ergibt.
AMP	Adenosinmonophosphat
AS-70	Enzymfraktion
ATP	Adenosintriphosphat
CPK	Kreatinphosphokinase
CTP	Zytosintriphosphat
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dpm	Anzahl der Zerfallsereignisse pro Minute
DTT	Dithiotreitol
FG	Feuchtgewicht
GTP	Guanosintriphosphat
Leu	Leuzin
Lys	Lysin
M	molar
Met	Methionin
MG	Molekulargewicht
Mg-Azetat	Magnesium-Azetat
m-RNS	messenger-Ribonukleinsäure
N	normal
pH-5	Enzymfraktion
Phe	Phenylalanin
Poly-U	Poly-Uridylsäure
RNAse	Ribonuklease
S-12	postmitochondriale Überstandsfraktion
S-100	postmikrosomale Überstandsfraktion
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
t-RNS	transfer-Ribonukleinsäure (die spezifisch gebundene Aminosäure wird im Index angegeben)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettstrahlung

1. Einleitung

1.1. Anwendungsbereich der in vitro-Untersuchungsmethoden der Proteinsynthese

Die Entwicklung der Molekularbiologie gewinnt auch in der Medizin zunehmend an Bedeutung, da sie einen biochemischen Forschungsansatz zur Untersuchung der Pathogenese von Erkrankungen mit hereditärer Komponente ermöglicht. In menschlichem Gewebe sind der Untersuchung der Struktur der Desoxyribonukleinsäure (DNS) selbst zur Zeit jedoch noch ebenso enge Grenzen gesetzt wie der Untersuchung der Transskription und der nachfolgenden Reifung der Ribonukleinsäuren (RNS). Im Gegensatz dazu sind die Translation der genetischen Information und regulatorische Vorgänge um den Mechanismus der Proteinbiosynthese auch in kernhaltigen Zellen schon recht gut bekannt (Sueoka und Kano-Sueoka, 1970; Brimacombe et al., 1978). (Einen kurzen Überblick über den Ablauf der Proteinbiosynthese in Eukaryonten gibt Anhang A). So hat in der Differentialdiagnose der Hämoglobinopathien die Untersuchung des proteinsynthetisierenden Apparats der Erythrozyten bereits eine praktische Bedeutung erlangt (Bank, 1978; Bank und Ramirez, 1978; Forget, 1979; Hehlmann, 1980).

Ein solcher molekularbiologischer Forschungsansatz dürfte aber auch bei einer Reihe von erblichen Muskelerkrankungen von besonderer Bedeutung sein, die durch eine Degeneration der Muskelfasern charakterisiert sind (Simon et al., 1958; Baker, 1960; Simon et al., 1962; Kruh et al., 1964; Monckton und Nihei, 1966; Srivastava und Berlinguet, 1966; Srivastava, 1969; Ionasescu et al., 1970, 1973, 1976). Denn zum einen weist ihre Heredität diese Erkrankungen als

molekularbiologisch verursacht aus, zum anderen läßt die funktionelle Beziehung zwischen Hämoglobinen und Myoglobinen ähnliche pathogenetische Mechanismen möglich erscheinen.

Einer biochemischen Untersuchung hereditärer Muskelerkrankungen kommt die Tatsache entgegen, daß in den Skelettmuskelfasern relativ wenige Eiweißkörper in großen Mengen synthetisiert werden. Methodisch wird zur Untersuchung des proteinsynthetisierenden Apparats pro- und eukaryotischer Zellen die Technik der zellfreien Proteinsynthese verwendet. Dabei werden die Einzelkomponenten des proteinsynthetisierenden Apparats der Zellen in reiner Form isoliert und unter geeigneten Ionen- und Energiebedingungen mit radioaktiv markierten Aminosäuren als Vorstufen der zu synthetisierenden Proteine im Reagenzglas inkubiert. Dabei erfolgt die Synthese der zelleigenen Eiweißkörper in vitro entsprechend dem Informationsgehalt der in die Testansätze eingebrachten Messenger-Ribonukleinsäure (m-RNS). Dieses Verfahren wird nicht nur in bakteriellen und niederen eukaryotischen (Hefen) proteinsynthetisierenden Systemen, sondern auch in Systemen aus menschlichem Gewebe erfolgreich angewendet (Munro et al., 1964; Godin et al., 1968; Falvey und Staehelin, 1970; Zomzely-Neurath, 1973).

1.2. Problemstellung

Voraussetzung für die Untersuchungen proteinsynthetisierender in vitro-Systemen sind einerseits effektive Isolierungstechniken für die Einzelbestandteile des proteinsynthetisierenden Apparats, andererseits eine standardisierte Zusammensetzung des Reaktionsgemischs, die nach Möglichkeit optimale Bedingungen für die in vitro-

Proteinsynthese schafft. Diese Fragestellungen sind an Skelettmuskelgewebe erst selten systematisch untersucht worden (Isolierung: Bullock et al., 1967; Chen und Young, 1967; Dowben et al., 1968. Reaktionsgemisch: Korner, 1961; Breuer et al., 1964; Wool und Cavicchi, 1967; Cooper et al., 1968; Castles und Wool, 1972).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher, die bisher vorliegenden Isolierungstechniken und Erfahrungen in der Entwicklung zellfreier proteinsynthetisierender Systeme auf Muskelgewebe zu übertragen. Diese Experimente sollen als Grundlage für die spätere Untersuchung menschlichen Biopsiematerials von Patienten mit hereditären Muskelerkrankungen dienen.

Untersucht wird:

1. der Einfluß der Präparationsbedingungen (Homogenisierung des Gewebes, Zusammensetzung der verwendeten Pufferlösung) auf die Ausbeute an biologisch aktiven Ribosomen, Messenger-Ribosomen-Komplexen und t-RNS aus Muskelgewebe;
2. der Einfluß von Konzentrationsverhältnissen (Ribosomen, Messenger-Ribosomen-Komplexe, t-RNS, Enzyme und Magnesium-Ionen) und der Inkubationsdauer des Versuchsansatzes auf die Aktivität der Proteinsynthese in polysomalen und ribosomalen in vitro-Systemen sowie in Systemen der Aminoazylierung der t-RNS.

2. Materialien und Methoden

2.1. Versuchstiere

Als Ausgangsmaterial diente Extremitätenmuskulatur vom Kaninchen (Chinchilla-Hybriden). Die Tiere wurden durch

Entbluten durch die Karotiden getötet und das entnommene Muskelgewebe sofort in flüssigem Stickstoff (-196°C) eingefroren, so daß zwischen dem Tod des Tieres und der Konservierung des Materials weniger als zwei Minuten vergingen. Das Gewebe wurde in Einzelportionen à 10-15 Gramm bei einer Temperatur von -80°C aufbewahrt.

2.2. Substanzen und Geräte

2.2.1. Substanzen

Adenosintriphosphat	Boehringer, Mannheim
[^{14}C]-Aminosäuren:	Amersham Buchler, Braunschweig
Leuzin (59 bzw. 278 mCi/mMol	
Lysin (60 mCi/mMol)	
Methionin (51 mCi/mMol)	
Phenylalanin (59 mCi/mMol)	
Protein-Hydrolysat (51 mCi/mA C)	
[^{35}S]-Aminosäuren:	Amersham Buchler, Braunschweig
Methionin (1120 mCi/mMol)	
Dithiotreitol	Calbiochem, Lahn
Kreatinphosphat	Boehringer, Mannheim
Kreatinphosphokinase	Boehringer, Mannheim
Liquifluor	NEN New England Nuclear, Dreieich
Poly-Uridylsäure	Miles-Laboratorien, Elkhart, Indiana, USA
Proteinase K	Boehringer, Mannheim
Sephadex G 25	Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden

Triton X-100	Serva, Heidelberg
Zytosintriphosphat	Boehringer, Mannheim
Filterplättchen (Nr. 598, ⌀ 25 mm)	Schleicher & Schüll, Dassel
'Selecta' Faltenfilter (Nr. 595½, ⌀ 320 mm)	Schleicher & Schüll, Dassel
Visking-Dialyseschläuche (Nr. 44110 u. 44114) Vorbereitung: Zur Reinigung von RNAse 2 h Auskochen, Dialyse über 24 h gegen 10^{-6} M Magnesiumazetat	Serva, Heidelberg

Alle übrigen verwendeten Substanzen waren analysenrein.

2.2.2.. Geräte

Homogenisatoren

'Potter S'	Braun, Melsungen
'Ultraturrax' (n. Prof. P.Willems, TP 18-10)	Janke & Kunkel KG, Staufen
Dounce Glas-Glas-Homogenisatoren	Tri-R-Instruments, Rockville, N.Y., USA
'Sonifier' Ultraschall-Desintegrator	Branson Sonic Power Comp., Danbury, Conn., USA

Meßgeräte

Registrierendes Spektralphotometer 'UV 200'	Shimadzu, Tokyo, Japan
Colora Recorder 1100	Colora GmbH, Lorch/Württ.
'Tricarb' Flüssigkeitsszintillations-Spektrometer	Packard, Frankfurt a.M.

Zentrifugen

Präparative Ultrazentrifuge 'Omega II 70000'	Heraeus-Christ
Zentrifuge 'SS 34'	Sorvall, Newtown, Conn., USA

2.3. Präparationsmethoden

2.3.1. Pufferlösungen

Zur Präparation der Ribosomen, Messenger-Ribosomen-Komplexe (Polysomen), t-RNS, der postmitochondrialen Überstandsfraktion (S-12-Fraktion) und der Enzyme wurden drei verschiedene Pufferlösungen benutzt. Es handelte sich um Tris-Puffersysteme, die sich im wesentlichen durch ihren Gehalt an monovalenten und divalenten Kationen und durch die Zugabe von Dithiotreitol unterschieden. Die genaue Zusammensetzung ist in Tabelle 1 angegeben.

Tabelle 1 Pufferlösungen

Nr.	Modifiziert nach:	Zusammensetzung
I	Earl und Morgan (1968)	0.02 M Tris-HCl, pH 7.6 0.1 M KCl 0.05 M NaCl 0.001 M Magnesium-Azetat 0.25 M NH_4Cl 0.25 M Saccharose
II	Earl und Morgan (1968)	wie I, ohne NH_4Cl
III	Munro et al., (1964)	0.02 M Tris-HCl, pH 7.6 0.1 M KCl 0.04 M NaCl 0.01 M Magnesium-Azetat 0.001 M DTT 0.008 M NH_4Cl 0.25 M Saccharose

2.3.2. Polysomen und Ribosomen

Ribosomen liegen in Eukaryonten in vivo zum überwiegenden Teil gebunden an m-RNS als Messenger-Ribosomen-Komplexe oder Polysomen vor. Die Fraktion der Ribonukleoproteinpartikel (RNP) einer kernhaltigen Zelle besteht also aus Polysomen und Ribosomen, die teils in freier Form vorliegen, teils dagegen an die endoplasmatischen Membranen gebunden sind. Innerhalb des Präparationsganges wurden aus der RNP-Fraktion erst die Polysomen und anschließend die Ribosomen isoliert. Die RNP-Fraktionen wurden einzeln und völlig unabhängig voneinander präpariert. Die Präparationsmethode für die RNP-Fraktion wurde hinsichtlich der Homogenisierung des Ausgangsgewebes und hinsichtlich der Zusammensetzung der verwendeten Pufferlösung variiert. Die Weiterverarbeitung des so gewonnenen Homogenats erfolgte dagegen stets auf die gleiche Weise.

2.3.2.1. Präparation der RNP-Fraktion

Zur Präparation der RNP-Fraktion wurden jeweils etwa 10-15 Gramm Muskelgewebe verwendet. Die Temperatur während des gesamten Präparationsvorgangs betrug 0°C. Homogenisierung und Pufferlösung wurden wie folgt variiert. (i) Bei identischer Suspendierung des Gewebes in Pufferlösung I wurde die Art der Homogenisierung variiert. (ii) Bei identischer Homogenisierungsmethode wurde die zur Suspendierung benutzte Pufferlösung variiert. (iii) Optimale Homogenisierungsmethode und optimale Pufferlösung wurden kombiniert.

Folgende Homogenisierungsmethoden wurden angewendet. (A) Das Gewebe wurde mit der Schere zerkleinert und anschließend mit Ultraturrax- und Potter-Homogenisator behandelt. (A*) Zusätzlich zur Behandlung A wurde das Homogenat mit Sauerstoff durchgast.

(B) Das Gewebe wurde homogenisiert wie unter A beschrieben und zusätzlich mit dem 'Sonifier'-Ultraschalldesintegrator behandelt. (C) Das Gewebe wurde mit flüssigem Stickstoff übergossen und im Mörser pulverisiert.

Während der Homogenisierung wurde das Gewebe im vierfachen Volumen der Pufferlösung Nr. I, II oder III (s. Tabelle 1) suspendiert. Bei Verwendung der Pufferlösung I wurde das im Gewebe enthaltene Myosin vollständig gelöst, während es durch die niedrigeren Konzentrationen monovalenter Kationen in den Pufferlösungen II und III teilweise ausgefällt wurde. Puffer III enthielt zusätzlich Dithiotreitol zum Schutz der Sulfhydrylgruppen der Proteine.

Dem Homogenat wurde das Detergens Triton X-100 in der Endkonzentration von 1% zugesetzt. Das Homogenat wurde dann mit 12.000facher Erdbeschleunigung (12.000 x g) zentrifugiert, wodurch eine scharfe Trennung in Sediment und Überstand erzielt wurde. Der klare Überstand stellte die postmitochondriale Überstandsfraktion (S-12-Fraktion) dar. Das Sediment wurde mit dem doppelten Volumen Pufferlösung nachextrahiert; die Überstände wurden vereinigt, das Sediment der zweiten Zentrifugation wurde verworfen. Die vereinigte S-12-Fraktion wurde 2 Stunden bei 105.000 x g zentrifugiert. Der klare Überstand stellte die postmikrosomale Überstandsfraktion (S-100-Fraktion) dar. Das feste, glasige Sediment enthielt die Ribonukleoproteinpartikel. Diese wurden zur Extraktion noch enthaltenen Myosins in 10 ml Pufferlösung II suspendiert, in einem Dounce Glas-Glas-Homogenisator homogenisiert und das ausfallende Myosin durch 20minütige Zentrifugation bei 12.000 x g entfernt. Nach Reextraktion des Sediments mit 5 ml Pufferlösung II wurden die Überstände beider Zentrifugationsschritte zur RNP-Fraktion vereinigt.

Tabelle 2 faßt den allgemeinen Präparationsgang der RNP-Fraktion zusammen. Tabelle 3 zeigt die Variationen der Homogenisierung und Suspendierung des Ausgangsmaterials.

Tabelle 2 Allgemeiner Präparationsgang der RNP-Fraktion

Ausgangsmaterial: 10-15 g Muskelgewebe

1.) Homogenisierung

2.) Suspendierung im 4fachen Volumen Puffer; Zusatz des Detergens Triton X-100 zur Endkonzentration von 1%

3.) Zentrifugation bei 12.000 x g, 20 Minuten

- Überstand: S-12-Fraktion
- Sediment: Reextraktion mit 2fachem Volumen Puffer
  - Überstand: S-12-Fraktion
  - Sediment: verwerfen

Vereinigte S-12-Fraktion (post-mitochondriale Überstandsfraktion)

4.) Zentrifugation bei 105.000 x g, 2 Stunden

- Überstand: S-100-Fraktion
- Sediment: RNP-Fraktion

5.) Myosinextraktion:

Suspendierung der Ribonukleoproteinpartikel in 10 ml Puffer II,
Homogenisation (Dounce),
Zentrifugation bei 12.000 x g, 20 Minuten,
Reextraktion des Sediments mit 5 ml Puffer II,
Vereinigung beider Überstände zur RNP-Fraktion.

Tabelle 3 Variationen der Homogenisierung und Suspendierung des Ausgangsmaterials

Puffer	Homogenisierung	Puffer	Homogenisierung	Puffer	Homogenisierung
I Hohe Konz. monoval. Kationen	A Schere Ultraturrax 5-10 min Stufe 6 Potter 30 Schübe 1000 Upm A* zusätzlich O_2, 30 min	I Hohe Konz. monoval. Kationen	B Schere Ultraturrax 5-10 min Stufe 6 Potter 30 Schübe 1000 Upm Sonifier 5 min Stufe 7	I Hohe Konz. monoval. Kationen	C Übergießen mit flüssigem N_2, Pulverisation im Mörser

Puffer	Homogenisierung
II Niedrige Konz. monoval. Kationen	A Schere Ultraturrax 5-10 min Stufe 6 Potter 30 Schübe 1000 Upm

Puffer	Homogenisierung
III Niedrige Konz. monoval. Kationen plus DTT	A Schere Ultraturrax 5-10 min Stufe 6 Potter 30 Schübe 1000 Upm

2.3.2.2. Auftrennung von Polysomen und Ribosomen

Die weitere Auftrennung der RNP-Fraktion erfolgte durch Dichtegradientenzentrifugation.

(a) Isolierung von Polysomen

Gesamt-Ribonukleoproteinpartikel wurden nach der von Falvey und Staehelin (1970) angegebenen Methode auf einen diskontinuierlichen Zuckergradienten von 0.5-2.0 M aufgetragen; die Zuckerlösungen enthielten in Anlehnung an Earl und Morgan (1968):

0.02 M Tris-HCl, pH 7.6
0.1 M KCl
0.05 M NaCl
0.001 M Magnesium-Azetat
0.5 M bzw.
2.0 M Saccharose

Nach 16stündiger Zentrifugation bei 105.000 x g befanden sich im Sediment Polysomen, an der Phasengrenze zwischen 0.5 M und 2.0 M Zuckerlösung die monomeren Ribosomen. Die sedimentierten Polysomen wurden in 500-1000 µl des verwendeten Präparationspuffers suspendiert und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

(b) Isolierung von Ribosomen

Der Überstand aus der oben beschriebenen Dichtegradientenzentrifugation wurde homogenisiert und erneut für drei Stunden bei 150.000 x g zentrifugiert. Die monomeren Ribosomen waren im Sediment enthalten. Sie wurden wie die Polysomen suspendiert und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

2.3.3. t-RNS

Als Ausgangsmaterial für die Isolierung von t-RNS diente entweder die postmikrosomale Überstandsfraktion (S-100-Fraktion) oder ein ungereinigtes Zellhomogenat aus 10-15 g Skelettmuskelgewebe. Die S-100-Fraktion wurde gemäß Tabelle 2, 1.)-4.), in den Variationen der

Tabelle 3 präpariert. Das Homogenat wurde gemäß Tabelle 2, 1.) - 2.), jedoch ausschließlich in der Variation IA der Tabelle 3 hergestellt.

Die S-100-Fraktion bzw. das Homogenat wurden zuerst mit SDS und Proteinase K behandelt, um freigesetzte Ribonukleasen zu inaktivieren (Rushizky et al., 1963; Wiegers und Hilz, 1970; Gross-Bellard et al., 1973; Hilz et al., 1975; Mendelsohn und Young, 1978). Zur Lipidextraktion und Proteindenaturierung wurde eine kalte Phenolextraktion vorgenommen (Avital und Elson, 1969). Zum Zellextrakt wurden in einstündigem Abstand Phenolreagenz (500 ml Phenol, 70 ml m-Kresol, 500 mg Hydroxychinolin, 110 ml Aqua dest.) und Chloroform hinzugefügt. Dabei verhielten sich die Volumina von Zellextrakt und Phenolreagenz wie 1:1, die Volumina von Chloroform und Phenolreagenz wie 0.1:1. Das Gemisch wurde bei 2-3°C 8-12 Stunden gerührt und bei 12.000 x g 20 Minuten zentrifugiert. Dabei ergab sich eine scharfe Trennung in drei Phasen: am Boden des Zentrifugenglases die klare grüne Phenolphase, darüber stellten sich als weiße watteartige Schicht die denaturierten Proteine ein, und über der Proteinphase lag die klare Wasserphase. Die wäßrige Phase wurde abpipettiert und mit dem doppelten Volumen Diäthyläther im Schütteltrichter ausgeschüttelt, um Phenolrückstände zu entfernen; Phenolphase und Proteinschicht wurden verworfen. Nach Einstellung einer scharfen Phasengrenze zwischen Wasser- und Ätherphase im Schütteltrichter wurde die wäßrige Phase gewonnen und zur Entfernung des restlichen Äthers mit Stickstoff durchgast. Ätherextraktion und Entätherung wurden bei 0°C vorgenommen. Anschließend wurden die Nukleinsäuren durch Zusatz von Äthanol + 2% Kalium-Azetat über mindestens 3 Stunden bei -20°C gefällt und durch Zentrifugation als Sediment gewonnen. Durch Aufnahme in Tris-HCl, pH 8.0, und Inkubation bei 37°C wurden die t-RNS-Moleküle desazyliert. Nach erneuter Fällung und Zentrifugation wie oben beschrieben

Tabelle 4 Präparationsgang der t-RNS

Ausgangsmaterial: S-100-Fraktion oder Homogenat aus 10-15 Gramm Muskelgewebe

Präparationsschritt		Zentrifugation	Weiterverarb. Anteil
1. Inaktivierung der RNAsen	Inkubation mit 40 µg/ml Proteinase K 0.5% SDS bei 37°C 60' rühren	-	alles
2. Lipidextraktion Proteindenaturierung	Zusatz von Phenolreagenz (1:1) Zusatz von Chloroform nach 60' (1/10 des Phenolvolumens)	12000 g, 20', SS-34-Zentrifuge	wäßrige Phase
3. Ätherextraktion	Ausschütteln mit Diäthyläther	-	wäßrige Phase
4. Entätherung	Durchgasen mit N_2, 60'	-	alles
5. Fällung	Zusatz von Äthanol + 2% Kaliumazetat (2.5 faches Vol.)	wie 2.)	Überstand
6. Desazylierung	Suspendierung in Tris-HCl (10 ml) Homogenisierung (Dounce) 60' bei 20°C rühren	wie 2.)	Überstand
7. Fällung	wie 5.)	wie 2.)	Sediment
8. Extraktion der t-RNS	Suspendierung in LiCl, Homogenisierung (Dounce)	wie 2.) Reextraktion	Vereinigte Überstände
9. Entfernung von LiCl und Mononukl.	Dialyse gegen Magnesiumazetat (5 l, 10^{-6} M) 12 h bei 3°C	-	Schlauchinhalt
10. Fällung	wie 5.)	wie 2.)	Sediment
11. Lösung d. t-RNS	Aufnahme in 500 - 1000 ul Puffer	3000 x g, 5'	Überstand = t-RNS

wurde das Sediment mit Warmluft getrocknet und die t-RNS extrahiert. Hierzu wurde das Sediment in 2 M Lithiumchloridlösung, pH 5.1, bei 20°C aufgenommen, da t-RNS im Gegensatz zu ribosomaler RNS und höhermolekularen DNS-Bruchstücken in Lithiumchlorid löslich ist (Avital und Elson, 1969). Nach erneuter Zentrifugation und Reextraktion des Sediments wurden die vereinigten Überstände zur Entfernung von LiCl-Ionen und Oligonukleotiden in Visking-Dialyseschläuchen 12 Stunden gegen Magnesium-Azetatlösung (5·1 10^{-6} M Magnesium-Azetat) bei 3°C dialysiert. Der Schlauchinhalt wurde wie beschrieben gefällt und zentrifugiert, wobei die t-RNS sedimentierte. Sie wurde in 500-1000 µl Pufferlösung aufgenommen, homogenisiert und nochmals 5 Minuten bei 3.000 x g und einer Temperatur von 2°C zentrifugiert, um unlösliche Rückstände zu entfernen. Der Überstand dieser letzten Zentrifugation stellte die t-RNS-Fraktion dar. Diese wurde bei einer Temperatur von -20°C aufbewahrt.

Eine Zusammenfassung des Präparationsganges der t-RNS zeigt Tabelle 4.

2.3.4. Enzyme

Als Enzymfraktionen wurden präpariert:

(i) die postmikrosomale Überstandsfraktion (S-100-Fraktion, Nirenberg et al., 1965)
(ii) die S-100-Fraktion nach Chromatographie über Sephadex G-25
(iii) die pH-5-Fraktion (Zomzely-Neurath, 1972)
(iv) die AS-70-Fraktion (Zomzely-Neurath, 1973)

Präparation der pH-5-Fraktion

Die pH-5-Fraktion wurde in Anlehnung an Zomzely-Neurath (1972) hergestellt. Aus der verdünnten detergentienfreien S-100-Fraktion wurde das Protein durch pH-Erniedrigung auf pH 4.7 ausgefällt und durch Zentrifugation als Sediment gewonnen. Das sedimentierte Protein wurde in Pufferlösung suspendiert und durch erneute Zentrifugation von unlöslichen Rückständen befreit. Nach pH-Einstellung mit 1 N Kalilauge auf pH 7.4 wurde die Enzymfraktion in flüssigem Stickstoff eingefroren. Einzelheiten des Präparationsvorganges zeigt Tabelle 5.

Tabelle 5 Präparation der pH-5-Fraktion

Ausgangsmaterial: Detergentienfreie S-100-Fraktion aus 10-15 Gramm Muskelgewebe

Präparationsschritt		Zentrifugation	Weiterverarb.Anteil
Verdünnung	mit Puffer I auf 9 ml/g Gewebe	-	alles
Proteinausfällung	pH-Einstellung auf pH 4.7 mit 1 N Essigsäure	12000 x g, 20', bei 3°C	Sediment
Suspendierung	in 5 ml Puffer I Homogenisation	5000 x g, 15', 3°C	Überstand
pH-Einstel-	auf pH 7.4 mit 1 N KOH	-	alles; Aufbewahrung in flüssigem N_2

Präparation der AS-70-Fraktion

Die AS-70-Fraktion wurde in Anlehnung an Zomzely-Neurath (1973) präpariert. Die Proteine der S-100-Fraktion wurden durch Zugabe von Ammoniumsulfat bis zur 70%igen Sättigung ausgesalzen und durch Zentrifugation als Sediment gewonnen. Dieses wurde in Puffer aufgenommen und durch Dialyse gereinigt. Einzelheiten des Präparationsganges zeigt Tabelle 6.

Tabelle 6 Präparation der AS-70-Fraktion

Ausgangsmaterial: Detergentienfreie S-100-Fraktion aus 10-15 Gramm Muskelgewebe

Präparationsschritt		Zentrifugation	Weiterverarb.Anteil
Aussalzung	Zugabe von $(NH_4)_2SO_4$ bis zur 70%igen Sättigung bei 0°C	12000 g 20' bei 3°C	Sediment
Suspendierung	in 5 ml Puffer 0.02 M Tris-HCl, pH 7.6 0.25 M KCl 0.001 M Mg-Azetat 0.25 M Saccharose	-	alles
Dialyse	gegen 5 ml Puffer 0.02 M Tris-HCl, pH 7.6 0.25 M KCl 0.01 M Mg-Azetat 0.25 M Saccharose	-	Schlauchinhalt; Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff

2.3.5. Postmitochondriale Überstandsfraktion

Der Präparationsgang entsprach Tabelle 2, 1.) - 3.). Das Gewebe wurde gemäß den Variationen IA und IIA der Tabelle 3, jedoch ohne Detergentienzusatz, homogenisiert und suspendiert. Die Aufbewahrung erfolgte bei einer Temperatur von $-80^{\circ}C$.

2.3.6. Bestimmung des Gehalts an extrahierbaren Ribosomen, Polysomen, t-RNS und Enzymen

Die Bestimmung des Gehalts an Ribosomen, Polysomen und t-RNS erfolgte spektrometrisch anhand der UV-Absorption. Dabei wurden folgende Beziehungen zugrunde gelegt:

t-RNS:	$0.5\ A_{260} \triangleq 25\ \mu g \triangleq 1$ nMol	(Neth et al., 1968)
Ribosomen:	$13.1\ A_{260} \triangleq 1$ mg	(Neth et al., 1968)
Polysomen:	$11.2\ A_{260} \triangleq 1$ mg	(Mathias et al., 1964)

Eine A_{260}-Einheit ist die Menge an Ribonukleinsäure, deren Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm und einer Schichtdicke von 1 cm, multipliziert mit dem Volumen der Lösung, den Wert 1.0 ergibt.

Der Proteingehalt der Enzympräparationen wurde nach der Methode von Lowry et al. (1951) bei einer Wellenlänge von 720 nm mit Rinderserumalbumin als Standard gemessen.

2.4. Standardsysteme der zellfreien Proteinsynthese

In den zellfreien Systemen wird entweder die Proteinsynthese in vitro oder die Beladung der t-RNS mit den zugehörigen Aminosäuren gemessen. Allen Standardsystemen wird als Substrat radioaktiv markierte Aminosäure zugesetzt. Bei Versuchsende werden das neu synthetisierte Protein oder die Aminoazyl-t-RNS durch Säure gefällt. Die Menge der in säurefällbares Protein inkorporierten Radioaktivität, gemessen als Anzahl der Zerfallsereignisse in der Zeiteinheit, dient als Maß für die biologische Aktivität des Systems.

2.4.1. Polysomale Systeme

Mit polysomalen Systemen werden Initiations-, Elongations- und Terminationsphase der Proteinsynthese gemessen. Den polysomalen Systemen wird kein exogener Messenger zugefügt, da zelleigene m-RNS in den Polysomen enthalten ist. Die polysomalen Systeme enthielten pro ml Ansatzvolumen:

400 µg	Polysomen
100 µg	homologe t-RNS
600 µg	Enzymprotein (AS-70)
1 µMol	ATP
0.1 µMol	CTP
0.07 µMol	GTP
2 µMol	Kreatinphosphat
50 µg	Kreatinphosphokinase
20 µMol	Tris-HCl, pH 7.6
10 µMol	Magnesium-Azetat
140 µMol	Kaliumchlorid
2.5 µMol	Natriumchlorid
0.02 µMol	[^{14}C]-Protein-Hydrolysat, 51 mCi/mA C

2.4.2. Ribosomale Systeme

Da in den zellfreien Systemen mit monomeren Ribosomen keine endogene m-RNS enthalten ist, wird ein Messenger in Gestalt des künstlichen Homopolymers Poly-Uridylsäure zugefügt, das die Synthese von Poly-Phenylalanin codiert. Da dieser künstliche Messenger jedoch kein Startcodon besitzt, muß die Initiation der Proteinsynthese durch drastische Erhöhung der Magnesiumionenkonzentration auf 15 mM erzwungen werden. Da Terminationscodons ebenfalls fehlen, wird in den ribosomalen Systemen ausschließlich die Elongationsphase der Proteinsynthese gemessen; es kommt nicht zur Ablösung der synthetisierten Proteinkette vom Ribosom. Um Reste endogener m-RNS von den Ribosomen zu entfernen ('stripping'), wurde die Ansatzmischung vor dem Start der Poly-Phenylalanin-Synthese durch Zugabe von Poly-Uridylsäure 15 Minuten lang präinkubiert. Die ribosomalen Systeme enthielten pro ml Ansatzvolumen:

200 µg	Ribosomen
100 µg	homologe t-RNS
600 µg	Enzymprotein (AS-70)
200 µg	Poly-Uridylsäure
1 µMol	ATP
0.1 µMol	CTP
0.07 µMol	GTP
2 µMol	Kreatinphosphat
50 µg	Kreatinphosphokinase
20 µMol	Tris-HCl, pH 7.6
15 µMol	Magnesium-Azetat
140 µMol	Kaliumchlorid
2.5 µMol	Natriumchlorid
0.017 µMol	[^{14}C]-Phenylalanin, 59 mCi/mMol

2.4.3. Standardsysteme der Aminoazylierung der t-RNS

In diesen Systemen wird die Beladung der t-RNS mit den Aminosäuren als Vorstufen der zu synthetisierenden Proteine selektiv untersucht. Dieser Schritt der Aminoazylierung geht der Initiationsphase der Proteinsynthese unmittelbar voraus. Gemessen wird dabei die Beladung spezifischer t-RNS-Moleküle in dem aus Muskelgewebe extrahierten t-RNS-Gemisch mit der zugehörigen Aminosäure. Geprüft wurden die Aminosäuren Lysin, Methionin und Phenylalanin. Die Standardsysteme der Aminoacylierung der t-RNS enthielten pro ml Ansatzvolumen:

100 µg	t-RNS	
500 µg	Enzymprotein (AS-70)	
1 µMol	ATP	
0.1 µMol	CTP	
0.07 µMol	GTP	
2 µMol	Kreatinphosphat	
50 µg	Kreatinphosphokinase	
20 µMol	Tris-HCl, pH 7.6	
6 µMol	Magnesium-Azetat	
140 µMol	Kaliumchlorid	
2.5 µMol	Natriumchlorid	
1 µCi	[^{14}C]-Aminosäure:	
	Lysin,	60 mCi/mMol
	Methionin	51 mCi/mMol
	Phenylalanin	59 mCi/mMol

2.4.4. Zellfreie Systeme mit postmitochondrialer Überstandsfraktion (S-12-Fraktion)

In den S-12-Systemen wurde auf eine weitere Auftrennung der postmitochondrialen Überstandsfraktion verzichtet und diese direkt der Ansatzmischung zugegeben. Daher sind in diesen Systemen Ribosomen, Polysomen, t-RNS und Enzyme in ähnlichen Konzentrationsverhältnissen enthalten wie in der Zelle selbst. In diesen Systemen wird also - wie in den polysomalen Systemen - Initiations-, Elongations- und Terminationsphase der Proteinsynthese

gemessen. S-12-Systeme wurden untersucht, weil sie auch aus sehr geringen Materialmengen (0.5-1.0 g) herstellbar sind und sich daher zur Untersuchung von Muskelbiopsiematerial besonders eignen.

Die Reaktionsbedingungen in den S-12-Systemen entsprachen weitgehend denen der polysomalen Systeme, es wurden jedoch anstelle der Polysomen und Enzyme 600 µl S-12-Fraktion und anstelle des ^{14}C -Protein-Hydrolysats 1 µMol $[^{35}S]$-Methionin, 1120 mCi/mMol, in den Versuchsansätzen verwendet.

2.4.5. Entnahme und Weiterbehandlung der Proben

Die Ansatzgemische wurden bei 37°C inkubiert; der Zeitpunkt der Probenentnahme war vom untersuchten Standardsystem abhängig:

Art des Systems	Präinkubation	Probenentnahme nach...
Polysomale Systeme	-	30, 60, 90 min
Ribosomale Systeme	15 min	30, 60, 90 min
t-RNS-Systeme	-	15, 20 min
S-12-Systeme	-	90 min

Die Weiterverarbeitung der Proben erfolgte nach dem von Mans und Novelli (1960) beschriebenen Filterplättchenverfahren. Die Proben wurden auf Filterpapierplättchen pipettiert, Protein und Aminoazyl-t-RNS wurden durch Suspendieren der Plättchen in eiskalter 10%iger Trichloressigsäure (TCA) gefällt. Die Filterplättchen wurden dann viermal je 10 Minuten in eiskalter 5%iger TCA gewaschen und auf Faltenfiltern getrocknet. Zur Entfernung der in Form von $[^{14}C]$-Aminoazyl- an die t-RNS gebundenen Radioaktivität wurde eine 15minütige saure Hydrolyse in 95°C heißer 5%iger TCA angeschlossen. Dieser Schritt entfiel bei Proben aus den Systemen der Aminoazylierung der t-RNS.

Anschließend wurden die Filterplättchen zur Entfernung der vorhandenen Lipide 10 Minuten in einem 1:1-Gemisch aus Diäthyläther und Äthanol gewaschen, in Szintillationsgefäßen bei 50°C getrocknet, in je 10 ml Liquifluor-Szintillationsflüssigkeit (43 ml Liquifluor ad 1000 ml Toluol) suspendiert und ihre Radioaktivität in einem Szintillationsspektrometer gemessen. Bei dieser Meßtechnik ist eine Quenchkorrektur der einzelnen Proben nicht erforderlich, da die durch die Filter bedingten Löscheffekte in allen Proben gleich und vernachlässigbar gering sind.

3. Ergebnisse

3.1. Präparation der RNP-Fraktion und t-RNS

Tabelle 7 gibt die RNP- und t-RNS-Mengen in Mikrogramm pro Gramm Feuchtgewicht (ug/g FG) an, die mit den verschiedenen Präparationsverfahren (s. Tabelle 3) aus Muskelgewebe extrahiert wurden. Tabelle 8 zeigt die entsprechenden Werte für die t-RNS-Präparation direkt aus dem Zellhomogenat. Zusätzlich ist in beiden Tabellen der Reinheitsgrad der t-RNS angeführt. Als Maß der Reinheit wurden die Quotienten aus den Absorptionswerten der t-RNS bei 260 und 230 nm Wellenlänge (A_{260}/A_{230}) bzw. bei 260 und 280 nm Wellenlänge (A_{260}/A_{280}) ermittelt (Petermann, 1964). Die entsprechenden Werte einer zum Vergleich herangezogenen käuflichen reinen t-RNS-Präparation (Fa. Boehringer, Mannheim) betragen 2.07 (A_{260}/A_{230}) bzw. 1.875 (A_{260}/A_{280}). Neth et al. (1968) bestimmten den Quotienten A_{260}/A_{280} für reine Nukleinsäuren zu 2.04.

In den Verfahren IA, IB und IC wird bei gleicher Pufferlösung die Homogenisationsmethode variiert.

In den Verfahren IA, IIA und IIIA wird bei gleicher Homogenisationsmethode die Pufferlösung variiert. Verfahren IIIB vereinigt die Homogenisationsmethode, die die höchsten Ausbeuten lieferte (B), mit der Pufferlösung (III), die die besten Ergebnisse erbrachte. Ein abgekürztes Verfahren, bei dem anstelle der S-100-Fraktion ein ungereinigtes Gewebshomogenat benutzt wurde, wurde nur zur t-RNS-Präparation angewendet (s.Tabelle 8).

Für jedes Präparationsverfahren sind die Werte der durchgeführten Einzelpräparationen und der Mittelwert angegeben. Die statistische Prüfung der Mengendifferenzen erfolgte, wenn die Anzahl der Stichproben es zuließ, durch Berechnung der exakten zweiseitigen Zufallswahrscheinlichkeiten nach nonparametrischen Verfahren (Fisher-Pitman Randomisierungstest für 2 unabhängige Stichproben; s. Lienert, 1973).

3.1.1. RNP-Fraktion

Zwischen den einzelnen Präparationsverfahren bestehen signifikante Unterschiede bezüglich der RNP-Ausbeute (s. Tabelle 7).

In den Verfahren IA, IB und IC wurde der Homogenisationsvorgang variiert. Im Verfahren IA* wurde das Homogenat IA zusätzlich mit Sauerstoff durchgast. Dies bewirkte jedoch keine signifikante Änderung der RNP-Ausbeute (IA*vs. IA: $p = 0.18$). Die Verwendung des Ultraschall-Desintegrators (IB) steigerte dagegen die durchschnittliche Gesamtmenge an extrahierten RNP-Partikeln um rund das Dreifache gegenüber IA und IC (IB vs. IA: $p = 0.005$; IB vs. IC : $p = 0.029$). Die Homogenisation des Gewebes durch Gefrieren und Pulverisation im Mörser (IC) ergab keinen signifikanten Mengenunterschied gegenüber Verfahren IA. Verfahren IC erbrachte als einzige Methode aus-

schließlich biologisch inaktives Material.

Das günstigste Homogenisationsverfahren im Hinblick auf die extrahierte RNP-Menge ist also die Behandlung des Ausgangsgewebes mit dem Ultraschalldesintegrator zusätzlich zur Homogenisierung mit Schere, Ultraturrax und Potter.

In den Verfahren IA, IIA und IIIA wurde die Zusammensetzung des Extraktionspuffers variiert. Die Verwendung einer Pufferlösung mit niedriger Konzentration monovalenter Kationen (IIA) statt einer hohen Konzentration (IA) steigerte die extrahierte RNP-Menge auf mehr als das Doppelte (IIA vs. IA: $p = 0.02$). Zusatz von Dithiotreitol zur niedermolaren Pufferlösung (IIIA) steigerte die extrahierte RNP-Menge auf rund das Fünffache (IIIA vs. IA: $p = 0.04$). Die günstigste Pufferlösung im Hinblick auf die extrahierte RNP-Menge ist also Pufferlösung III.

Die Kombination der günstigsten Pufferlösung (III) mit der günstigsten Homogenisationsmethode (B) steigerte die extrahierte RNP-Menge gegenüber der Ausgangsmethode IA auf rund das Zwölffache (IIIB vs. IA: $p = 0.036$). Die Steigerung der Ausbeute gegenüber den zugrunde liegenden Verfahren IB und IIIA war wegen zu geringer Meßwertanzahl nicht prüfbar, wäre aber bei Vorliegen von mehr Meßwerten wahrscheinlich signifikant. Die Kombination der günstigsten Homogenisationsmethode mit der günstigsten Pufferlösung scheint daher effektiver zu sein als jede der beiden Maßnahmen allein.

3.1.2. t-RNS

Die statistischen Unterschiede zwischen den t-RNS-Ausbeuten der verschiedenen Präparationsverfahren waren wegen zu geringer Meßwertanzahl nicht prüfbar. Die mittleren Meßwerte der t-RNS- und der RNP-

Tabelle 7 Ausbeuten der RNP-Präparationen, Ausbeute und Reinheit der t-RNS-Präparationen

Bei den angegebenen Meßwerten handelt es sich um die Ergebnisse voneinander unabhängiger Einzelpräparationen.

Präparationsverfahren		RNP-Ausbeute	t-RNS-Ausbeute	t-RNS-Reinheit	
Puffer (s.Tab.1)	Homogenisierung (s.Tab.3)	µg/g FG	µg/g FG	$\frac{A_{260}}{A_{230}}$	$\frac{A_{260}}{A_{280}}$
I	A	50.8	21.5	1.90	1.90
		74.2	20.0	1.49	1.93
	Schere	100.0	17.5	1.84	2.00
	Ultraturrax	41.1			
	Potter	44.7			
		60.0			
		$\bar{x}$ 61.8	$\bar{x}$ 19.7	$\bar{x}$ 1.74	$\bar{x}$ 1.94
	A*	45.8	5.5	1.67	2.00
	Schere	41.1	22.5	1.61	1.81
	Ultraturrax				
	Potter	$\bar{x}$ 43.5	$\bar{x}$ 14.0	$\bar{x}$ 1.64	$\bar{x}$ 1.90
	Sauerstoff				
I	B	158.3	74.0	1.42	2.00
		253.3	69.5	1.67	1.92
	Schere	153.0			
	Ultraturrax	198.0			
	Potter				
	Ultraschall	$\bar{x}$ 190.7	$\bar{x}$ 71.7	$\bar{x}$ 1.54	$\bar{x}$ 1.96

Tabelle 7 Fortsetzung

Präparationsverfahren		RNP-Ausbeute	t-RNS-Ausbeute	t-RNS-Reinheit	
Puffer (s.Tab.1)	Homogenisierung (s.Tab.3)	µg/g FG	µg/g FG	$\frac{A_{260}}{A_{230}}$	$\frac{A_{260}}{A_{280}}$
I	C	84.0	9.0	1.75	2.00
		23.5	15.5	1.36	1,76
	Flüssiger	55.4			
	N_2, Pulverisieren	$\bar{x}$ 54.3	$\bar{x}$ 12.2	$\bar{x}$ 1.55	$\bar{x}$ 1.88
II	A	100,0	47.5	2.77	3.27
		175.0	49.5	2.30	2.09
	Schere	166.7			
	Ultraturrax				
	Potter	$\bar{x}$ 147.2	$\bar{x}$ 48.5	$\bar{x}$ 2.53	$\bar{x}$ 2.68
III	A				
		297.4	52,5	1.88	1.67
	Schere	281.7	40.0	2.00	2.00
	Ultraturrax				
	Potter	$\bar{x}$ 289.5	$\bar{x}$ 46.3	$\bar{x}$ 1.94	$\bar{x}$ 1.83
III	B				
		666.7	105.0	2.24	2.30
	Schere	775.0	100.0	0.47	3.20
	Ultraturrax				
	Potter	$\bar{x}$ 720.8	$\bar{x}$ 102.5	$\bar{x}$ 1.35	$\bar{x}$ 2.80
	Ultraschall				

Tabelle 8 Ausbeute und Reinheit der t-RNS-Präparation direkt aus dem Homogenat

Präparationsverfahren		t-RNS-Ausbeute	t-RNS-Reinheit	
Puffer (s.Tab.1)	Homogenisierung (s.Tab.3)	µg/g FG	$\frac{A_{260}}{A_{230}}$	$\frac{A_{260}}{A_{280}}$
I	A			
	Schere	87.5	1.36	1.36
	Ultraturrax	93.5	2.15	1.44
	Potter	$\bar{x}$ · 90.5	$\bar{x}$ · 1.75	$\bar{x}$ · 1.40

Ausbeuten aller Präparationsverfahren kovariieren jedoch signifikant[1] ($r = 0.845$, $p = 0.005$). Dies zeigt, daß die t-RNS-Ausbeuten von den Bedingungsvariationen der Präparationsverfahren in ähnlicher Weise beeinflußt werden wie die RNP-Ausbeuten. Die Präparation direkt aus dem Zellhomogenat (s.Tabelle 8) wurde ausschließlich zur t-RNS-Isolierung angewendet. Der Verzicht auf einen Reinigungsschritt steigerte die extrahierte t-RNS-Menge auf rund das Fünffache gegenüber dem Ausgangsverfahren IA.

Die Reinheit der t-RNS zeigt keine statistisch signifikante Korrelation mit der extrahierten Menge ($r = 0.178$). Größere Reinheit der Präparation ist

---

[1] Pitman's Produkt-Moment-Korrelationstest, (in: Lienert, 1973)

nicht notwendig mit geringeren Materialmengen verbunden. So erbrachten diejenigen Präparationsverfahren , mit denen der höchste Reinheitsgrad der t-RNS erreicht wurde (IIA und IIIA, s. Tabelle 7) , die dritt- bzw. viertgrößte t-RNS-Ausbeute. Andere Präparationsverfahren (z.B. IA*) ergaben dagegen geringe Materialmengen von geringer Reinheit.

3.2. Standardsysteme der zellfreien Proteinsynthese

Aus den Einzelkomponenten des proteinsynthetisierenden Apparats, die mit den oben genannten Präparationsverfahren aus dem Gewebe isoliert worden waren, wurden vier Standardsysteme hergestellt: (1.) polysomale Systeme der zellfreien Proteinsynthese, (2.) ribosomale, Poly-Phenylalanin synthetisierende Systeme, (3.) Standardsysteme der Aminoazylierung der t-RNS und (4.) S-12-Systeme. Die biologische Aktivität dieser Systeme wurde in Abhängigkeit von folgenden Größen untersucht: (a) Inkubationsdauer des Reaktionsgemischs, (b) Konzentration von Polysomen, Ribosomen oder t-RNS, (c) Konzentration von Enzymen und (d) Konzentration von Magnesium-Ionen. Als Maß für die biologische Aktivität diente die Radioaktivität, die aus [^{14}C]- bzw. [^{35}S]-markierten Aminosäuren in TCA-fällbares Material inkorporiert wurde. Die biologische Aktivität wird entweder in dpm/ml Ansatzvolumen oder in pMol der inkorporierten Aminosäure angegeben. Da radioaktiv markierte Aminosäuren von unterschiedlicher spezifischer Aktivität verwendet wurden, sind die in dpm/ml angegebenen Meßwerte nicht immer vergleichbar.

3.2.1. Polysomale Systeme

Die in polysomalen Systemen gemessene biologische Aktivität umfaßt alle Phasen der Proteinsynthese: Initiation, Elongation und Termination (s. 2.4.1). Die Proteinsynthese wurde zuerst in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer des Versuchsansatzes gemessen (Abb. 1). Die Menge des synthetisierten Proteins steigt bis ca. 60 bis 70 Minuten linear mit der Inkubationsdauer an, danach flacht sich der Anstieg leicht ab. Abb. 2 stellt die Abhängigkeit des Einbaus markierter Aminosäuren von der Polysomenkonzentration dar. Zwischen beiden besteht ein monotoner Zusammenhang bis zur höchsten untersuchten Polysomenkonzentration von 1.2 mg/ml. Der Anstieg der Synthese verlangsamt sich bei höheren Konzentrationen, ohne jedoch in ein Plateau überzugehen. Unter den angegebenen Versuchsbedingungen steigt die synthetisierte Proteinmenge also stets mit der Polysomenkonzentration an. (Aus Gründen der Materialersparnis wurden die meisten Untersuchungen des polysomalen Systems mit 0.4 mg Polysomen/ml durchgeführt). Die Abhängigkeit der Proteinsynthese von der Enzymkonzentration wird in Abb. 3 gezeigt. Enzymkonzentrationen bis 0.55 mg/ml (Enzymmenge : Polysomenmenge = 1.5 : 1) steigern die Proteinsynthese, bei höheren Konzentrationen sinkt sie wieder ab. Auch durch hohe Magnesiumkonzentrationen sinkt die Proteinsynthese (Abb. 4): nach einem Anstieg bis 12 mM Magnesium fällt die Synthese wieder. Zusatz exogener t-RNS zu polysomalen Systemen der in vitro-Proteinsynthese ist nicht erforderlich, da die Polysomenfraktion selbst größere Mengen endogener t-RNS enthält (also t-RNS, die bei der Zentrifugation an diese Partikel gebunden bleibt und mit ihnen sedimentiert).

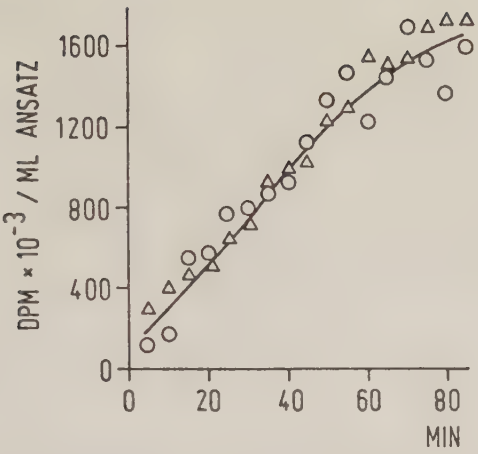

Abb. 1 Einbau markierter Aminosäuren in säurefällbares Protein im polysomalen Muskelsystem. Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

2 parallele, unabhängige Versuche. Zusammensetzung des Systems s. 2.4.1.

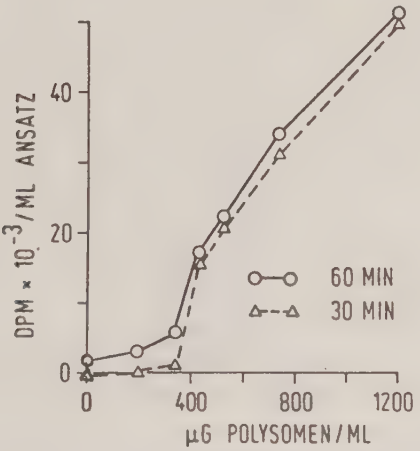

Abb. 2 Einbau markierter Aminosäuren in säurefällbares Protein im polysomalen Muskelsystem. Abhängigkeit von der Polysomenkonzentration.

Entnahme der Proben nach 30 und nach 60 Minuten. Zusammensetzung des Systems s. 2.4.1.

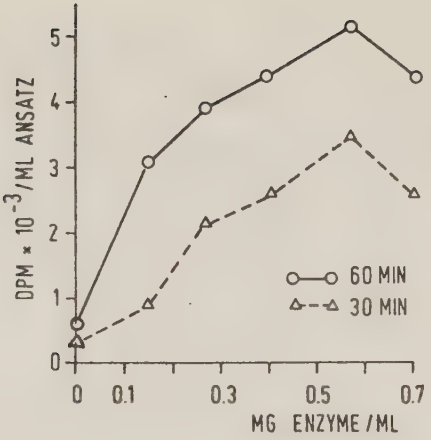

Abb. 3 Einbau markierter Aminosäuren in säurefällbares Protein im polysomalen Muskelsystem. Abhängigkeit von der Enzymkonzentration.

Entnahme der Proben nach 30 und nach 60 Minuten. Zusammensetzung des Systems s. 2.4.1.

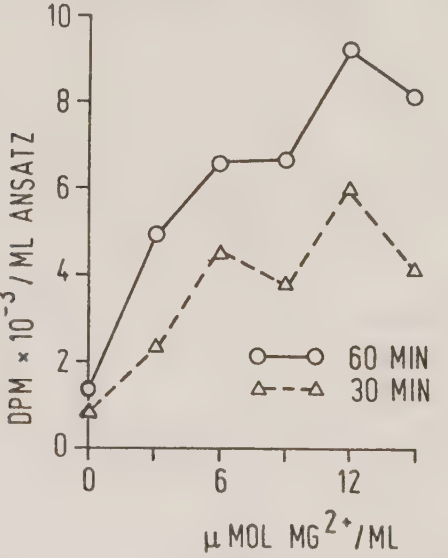

Abb. 4 Einbau markierter Aminosäuren in säurefällbares Protein im polysomalen Muskelsystem. Abhängigkeit von der Magnesium-Ionen-Konzentration.

Entnahme der Proben nach 30 und nach 60 Minuten. Zusammensetzung des Systems s. 2.4.1.

3.2.2. Ribosomale Systeme

In den zellfreien Systemen mit monomeren Ribosomen wird im wesentlichen die Elongationsphase der Proteinsynthese gemessen (s. 2.4.2.). In Abhängigkeit vom Informationsgehalt des künstlichen Messengermoleküls Poly-Uridylsäure wird an den Ribosomen Poly-Phenylalanin synthetisiert. Die Poly-U-abhängige Synthese von Poly-Phenylalanin steigt mit der Inkubationsdauer der Testansätze bis etwa 30 Minuten steil, dann immer langsamer an und ist nach etwa 70 Minuten beendet (Abb. 5). Die halbmaximale Synthese wird bereits nach 20 Minuten erreicht. Die Synthese ist der Ribosomenmenge bis zur höchsten untersuchten Konzentration von 0.4 mg/ml annähernd proportional (Abb. 6). Der Syntheseanstieg flacht sich bei höheren Konzentrationen leicht ab. Die Abhängigkeit der Proteinsynthese von der Enzymkonzentration zeigt Abb. 7: Sie steigt bis zu einer Konzentration von 0.6 mg Enzymen /ml (Enzymmenge : Ribosomenmenge = 3 : 1); höhere Enzymkonzentrationen bewirken ein Absinken der Synthese. In der Ribosomenfraktion ist im Gegensatz zur Polysomenfraktion keine endogene t-RNS enthalten. Es besteht jedoch eine deutliche Abhängigkeit der Poly-Phenylalanin-Synthese von der Konzentration exogener homologer t-RNS (Abb. 8). Die Synthese ist der Konzentration homologer t-RNS bis 0.3 mg/ml etwa proportional und fällt jenseits von 0.35 mg/ml wieder ab. Abb. 9 zeigt die Abhängigkeit der Synthese von der Magnesium-Ionen-Konzentration. Die Poly-Phenylalanin-Synthese ist der Magnesiumkonzentration bis 12 mM proportional und steigt dann steil bis 15 mM an. Höhere Konzentrationen bewirken keine weitere Steigerung, eher ein leichtes Absinken des Einbaus von markiertem Phenylalanin.

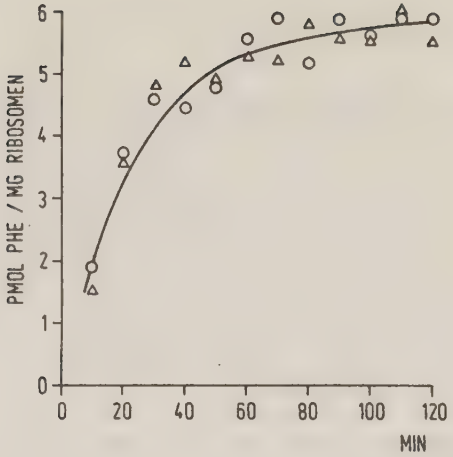

Abb. 5 Synthese von Poly-Phenylalanin im zellfreien System mit Muskelribosomen. Abhängigkeit von der Inkubationsdauer.

2 parallele, unabhängige Versuche. Zusammensetzung des Systems s. 2.4.2.

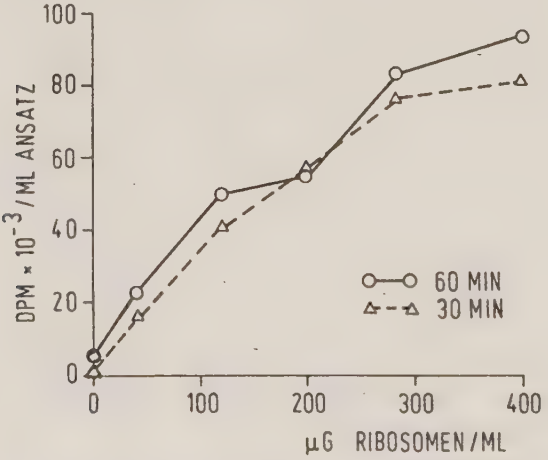

Abb. 6 Synthese von Poly-Phenylalanin im zellfreien System mit Muskelribosomen. Abhängigkeit von der Ribosomenkonzentration.

Entnahme der Proben nach 30 und nach 60 Minuten. Zusammensetzung des Systems s. 2.4.2.

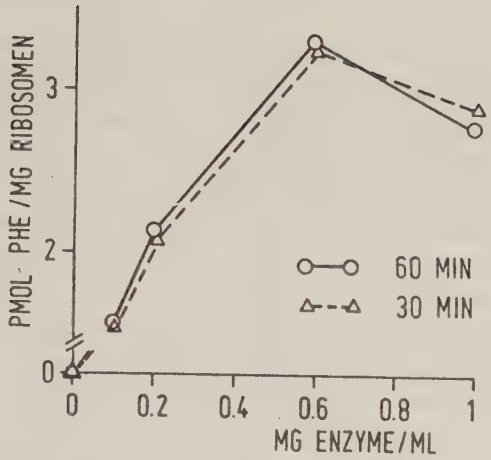

Abb. 7 Synthese von Poly-Phenylalanin im zellfreien System mit Muskelribosomen. Abhängigkeit von der Enzymkonzentration.

Entnahme der Proben nach 30 und nach 60 Minuten. Zusammensetzung des Systems s. 2.4.2.

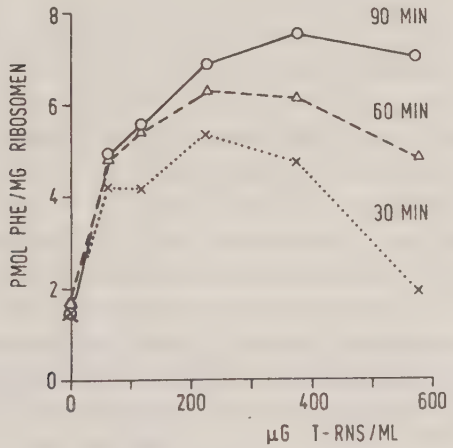

Abb. 8 Synthese von Poly-Phenylalanin im zellfreien System mit Muskelribosomen. Abhängigkeit von der Konzentration exogener, homologer t-RNS.

Entnahme der Proben nach 30, 60 und 90 Minuten. Zusammensetzung des Systems s. 2.4.2.

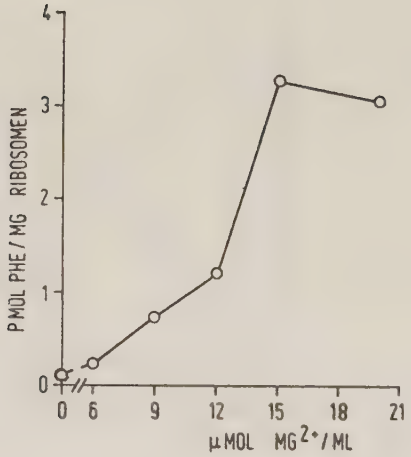

Abb. 9 Synthese von Poly-Phenylalanin im zellfreien System mit Muskelribosomen. Abhängigkeit von der Magnesium-Ionen-Konzentration.

Entnahme der Proben nach 60 Minuten. Zusammensetzung des Systems s. 2.4.2.

3.2.3. Systeme der Aminoazylierung der t-RNS

In den Standardsystemen zur Aminoazylierung der t-RNS wird in einem Gesamtgemisch der Muskel-t-RNS die Beladung einzelner spezifischer t-RNS-Moleküle mit ihren zugehörigen Aminosäuren untersucht. Die Abhängigkeit dieser Beladungsreaktion von den Versuchsbedingungen wurde jeweils für eine oder zwei spezifische t-RNS-Arten gemessen. Abb. 10 zeigt die Abhängigkeit der Beladungsreaktion von der Inkubationsdauer der Testansätze. Untersucht wurden die $t\text{-RNS}^{Lys}$ und die $t\text{-RNS}^{Phe}$. Beide Kurven verlaufen qualitativ ähnlich, leicht S-förmig. Die Aminoazylierung mit Phenylalanin steigt langsam bis zu einem breiten Maximum an, das nach ca. 12 bis 15 Minuten Inkubation erreicht ist, und fällt dann wieder ab. Die Beladung mit Lysin erreicht ihr Maximum erst nach 18 bis 20 Minuten (Ver-

suchsende). Für [^{14}C]-Lysin werden insgesamt höhere Werte und ein steilerer Anstieg gemessen als für [^{14}C]-Phenylalanin. Der Zusammenhang zwischen der Konzentration der t-RNS und ihrer Aminoazylierung wurde für die t-RNS^{Lys} und für die t-RNS^{Met} untersucht (Abb. 11). Die Inkorporation beider Aminosäuren in säurefällbare t-RNS steigt mit der t-RNS-Konzentration bis etwa 0.55 mg t-RNS /ml. Oberhalb davon steigt die Lysin-Inkorporation nicht weiter an. Auch hier werden für die t-RNS^{Lys} höhere Werte gemessen als für die parallel untersuchte Aminosäure (Methionin). Der Einfluß der Enzymproteinkonzentration auf die biologische Aktivität wird in Abb. 12 dargestellt. Die Untersuchung wurde mit [^{14}C]-Lys durchgeführt. Die Aminoazylierung steigt monoton mit der Enzymkonzentration bis 4.3 mg Enzyme/ml (Enzymmenge : t-RNS-Menge = 50 : 1) und fällt danach steil ab. Eine Erhöhung des Verhältnisses Enzymprotein : t-RNS über 50 : 1 hat somit eine Abnahme der Aminoazylierung zur Folge. Der Einfluß der relativen Konzentrationen von Magnesium-Ionen, ATP und CTP auf die Aminoazylierung der t-RNS wird in Tabelle 9 dargestellt. Die Untersuchung erfolgte mit [^{14}C]-Leuzin. Die höchsten Werte der Aminoazylierung werden gemessen, wenn sich die Konzentrationen von Mg^{2+}, ATP und CTP wie 50 : 10 : 1 oder wie 100 : 10 : 1 verhalten. Magnesiumkonzentrationen unter 10 mM, ATP-Konzentrationen unter 1 mM und ein Mg^{2+}/ATP-Quotient größer als 10 senken die Aminoazylierung der geprüften t-RNS. Am günstigsten sind Konzentrationen von 10 mM Mg^{2+}, 1-2 mM ATP und 0.1 - 0.2 mM CTP.

Tabelle 9 Mg^{2+}/ATP- und Mg^{2+}/CTP-Optimum des Standardsystems zur Aminoazylierung der t-RNS^{Leu}

	Konzentration in den Ansätzen [mM]				
Mg^{2+} [mM]	5	10	10	10	20
ATP [mM]	1	0.5	1.	2	1.
CTP [mM]	0.1	0.05	0.1	0.2	0.1
Mg^{2+}:ATP:CTP	50:10:1	200:10:1	100:10:1	50:10:1	200:10:1
pMol Leuzin / mg t-RNS	15.29	16.83	20.36	21.71	15.98

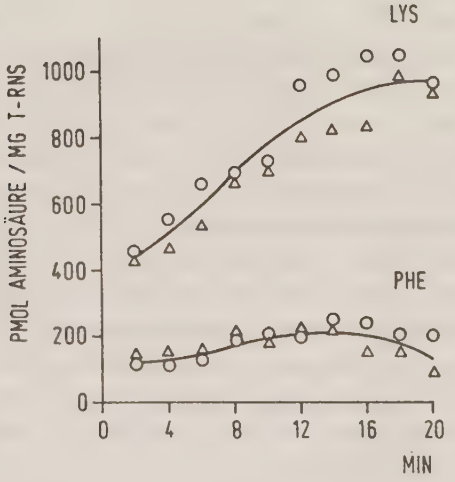

Abb. 10 Aminoazylierung der Muskel-t-RNS mit [^{14}C]-Lysin und [^{14}C]-Phenylalanin. Abhängigkeit von der Inkubationsdauer.

Je 2 parallele, unabhängige Versuche. Zusammensetzung der Systeme s. 2.4.3.

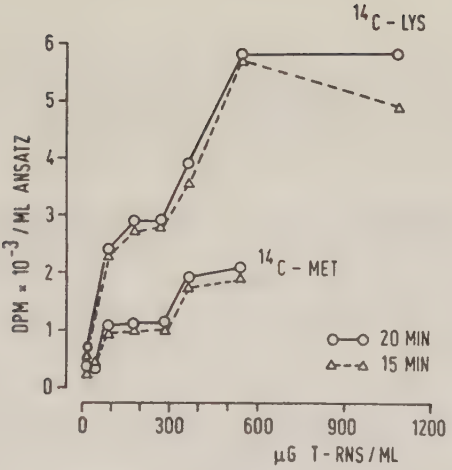

Abb. 11 Aminoazylierung der Muskel-t-RNS mit [^{14}C]-Lysin und [^{14}C]-Methionin. Abhängigkeit von der t-RNS-Konzentration in den Ansätzen.

Entnahme der Proben nach 15 und nach 20 Minuten Inkubation. Zusammensetzung der Systeme s.2.4.3.

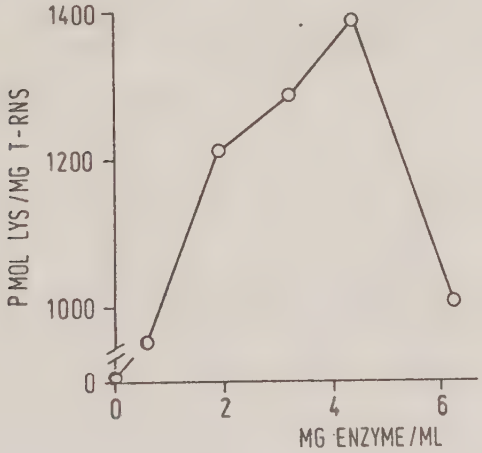

Abb. 12 Aminoazylierung der Muskel-t-RNS mit [^{14}C]-Lysin. Abhängigkeit von der Enzymkonzentration.

Entnahme der Proben nach 20 Minuten. Zusammensetzung des Systems s. 2.4.3.

3.2.4. Zellfreie Systeme mit postmitochondrialer Überstandsfraktion (S-12)

Die Systeme mit postmitochondrialer Überstandsfraktion enthalten die einzelnen Komponenten des proteinsynthetisierenden Apparats in einer Konzentration, die den Verhältnissen in vivo weitgehend entspricht. Die gemessene biologische Aktivität umfaßt daher (wie auch in den polysomalen Systemen) alle Schritte der Proteinsynthese. Die S-12-Fraktion war nach den Verfahren IA und IIA (s. Tabelle 3) hergestellt worden. Der Einfluß der Präparationsmethode auf die biologische Aktivität wurde im S-12-System untersucht. Durch partielle Entfernung des Myosins im Präparationsverfahren IIA sinkt der Einbau markierter Aminosäuren in den S-12-Systemen um rund ein Drittel. Zugabe homologer t-RNS (also zusätzlich zu der in der S-12-Fraktion enthaltenen 'endogenen' t-RNS) steigert die biologische Aktivität erheblich:

	Präparationsverfahren	
	IA	IIA
Ohne t-RNS-Zugabe	9084 dpm/ml	6081 dpm/ml
Mit homologer t-RNS	13515 dpm/ml	7100 dpm/ml

Diese Steigerung der Proteinsynthese durch Zusatz exogener Muskel-t-RNS wird auch bei der Untersuchung der Abhängigkeit der Proteinsynthese von der Inkubationsdauer deutlich (Abb. 13). Zwar steigt der Einbau markierter Aminosäuren in jedem Falle monoton mit der Zeit an; doch ohne zusätzliche t-RNS ist die Proteinsynthese geringer und ihr Anstieg flacher und kürzer. Während die Synthese bei Zugabe von t-RNS bis 90 Minuten nahezu linear ansteigt, ist die in vitro-Synthese des Muskelproteins ohne die zusätzliche t-RNS bereits nach 60 Minuten beendet.

Die biologische Aktivität des S-12-Systems kann also durch Zugabe homologer t-RNS gesteigert werden. Auch heterologe t-RNS (Escherichia coli, Kalbsleber) vermag die gemessene biologische Aktivität zu steigern:

Herkunft der t-RNS	Konzentration µg/ml	Biol. Aktivität dpm/ml
Muskel (homolog)	100	184.300
Kalbsleber	1.600	138.875
Escherichia coli	800	90.125

Es ist also eine vielfache Menge heterologer t-RNS nötig, um einen ähnlich hohen Einbau markierter Aminosäuren zu erzielen wie bei Zugabe von homologer t-RNS.

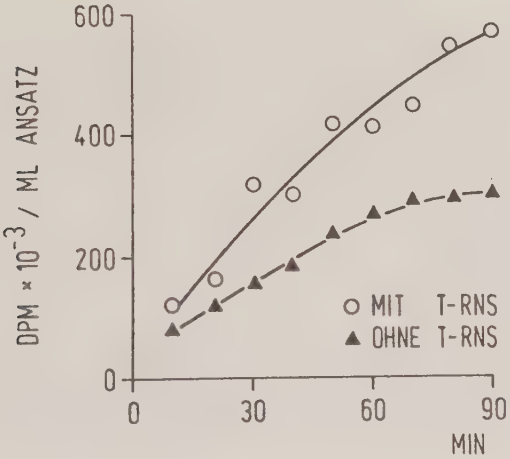

Abb. 13 Einbau von $[^{35}S]$-Methionin in säurefällbares Protein durch die S-12-Fraktion. Abhängigkeit von der Inkubationsdauer. Testansätze mit und ohne Zugabe von 100 ug homologer t-RNS pro ml.

Zusammensetzung des Systems s. 2.4.4.

3.2.5. Untersuchung verschiedener Enzymfraktionen

Die biologische Aktivität der gemäß Abschnitt 2.3.4. präparierten Enzymfraktionen wurde in einem Standardsystem der Aminoazylierung der t-RNS untersucht. Als Maß für die biologische Aktivität der Enzymfraktionen diente die Menge des von der zugehörigen spezifischen t-RNS akzeptierten Leuzins [pMol/mg t-RNS]. Zu den Versuchsansätzen wurden jeweils 0.4 mg Enzymprotein/ml zugegeben. Die mit den einzelnen Enzymfraktionen gemessenen Werte sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10 Ausbeuten und biologische Aktivität verschiedener Enzymfraktionen im zellfreien System zur Aminoazylierung der t-RNS^{Leu}

Enzymfraktion (400 µg Protein/ml Ansatz)	Ausbeute mg/g FG	Aminoazylierung pMol/mg t-RNS
S-100-Fraktion, roh	20	20.32
S-100-Fraktion, chromatographiert über Sephadex G-25 'M'	19	35.52
pH-5-Fraktion	5.9	3.69
AS-70-Fraktion[1)]	10.1	42.06

1) Da die AS-70-Fraktion die höchste biologische Aktivität aufwies, wurde diese Enzympräparation auch in allen übrigen Versuchen verwendet.

4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, funktionierende Systeme der zellfreien Proteinsynthese aus Skelettmuskelgewebe herzustellen. Da hierfür reine Präparationen der Einzelbestandteile des proteinsynthetisierenden Apparats erforderlich sind, mußte zuvor die am besten geeignete Isolierungstechnik für Ribosomen, Polysomen, t-RNS und Enzymen ermittelt werden.

Im folgenden sollen daher zunächst die Ergebnisse der Variation der Präparationsmethoden von RNP-Fraktion und t-RNS diskutiert werden, anschließend die Ergebnisse der Variation der Versuchsbedingungen in den zellfreien Systemen.

4.1. Präparation von RNP-Fraktion und t-RNS

Die Bedingungsvariation der Präparationsmethoden erfolgte mit dem Ziel, aus wenig Ausgangsmaterial eine möglichst große Menge biologisch aktiver Ribosomen, Polysomen und t-RNS möglichst rein zu isolieren, um diese dann für Standardsysteme der zellfreien Proteinsynthese zu verwenden. Nach der Aussonderung von Methoden, die biologisch inaktive Präparate liefern, ist das wichtigste Vergleichskriterium für die Präparationsverfahren die mit ihnen erreichbare Ausbeute, im Falle der t-RNS auch die Reinheit. Dagegen spielten Erwägungen der Vereinfachung oder Abkürzung des Verfahrens keine Rolle.

4.1.1. RNP-Fraktion

Die Isolierung von Ribonukleoproteinpartikeln wird dadurch erschwert, daß Ribosomen und Polysomen zusammen mit dem in der Muskelzelle enthaltenen Myosin sedimentieren (Heywood et al., 1968). Das Präparationsverfahren muß daher eine Trennung der Ribosomen und Polysomen vom Myosin erreichen, bevor dieses ausgefällt und durch Zentrifugation entfernt wird. Die Ausbeute an Ribonukleoproteinpartikeln ist von der Gewebehomogenisation abhängig: die günstigste Homogenisationsmethode besteht in der Zerkleinerung des Gewebes mit der Schere, Weiterbehandlung mit Ultraturrax- und Potter-Homogenisator und anschließender Ultraschallzertrümmerung (Tabelle 7, IB, IIIB). Ultraschall war bisher noch nicht angewendet worden; das Gewebe kann auf diese Weise bis zu einer durchschnittlichen Partikelgröße von 100 µm zerkleinert werden. Wahrscheinlich werden durch dieses Verfahren Ribosomen und Polysomen besser vom Myosin abgelöst und gehen bei dessen Ausfällung nicht mit verloren. Die Löslichkeit des Myosins ist von der Konzentration monovalenter Kationen im Extraktionspuffer abhängig. Bei einer Konzentration von 250 mM K^+ ist das Myosin weitgehend gelöst (Portzehl, 1950), unterhalb einer Konzentration von 100 mM K^+ fällt es aus (Szent-Györgyi, 1960). Auch die RNP-Ausbeute ist von der Konzentration der monovalenten Kationen K^+ und NH_4^+ abhängig: sie steigt bis 150 mM (Earl und Morgan, 1968) bzw. 250 mM (Heywood et al., 1968) an und sinkt dann wieder ab. Dies stimmt auch mit der Beobachtung von Castles und Wool (1972) überein, die bei Präparationen mit 80 mM K^+ im Extraktionspuffer um 50% geringere Ausbeuten erzielten als mit 250 mM.

Auch der Zeitpunkt der Myosinausfällung während des Präparationsvorganges beeinflußt die Ausbeute. Wird das Gewebe in einer Pufferlösung mit 400 mM monovalenten Kationen homogenisiert (Tabelle 7, IA, IA*, IB, IC), so daß das Myosin völlig gelöst ist, und wird das Myosin erst aus dem Niederschlag der Zentrifugation bei 100.000 x g durch Absenken der Kaliumkonzentration ausgefällt, dann liegen die RNP-Ausbeuten signifikant unter denjenigen, die durch Gewebehomogenisation in Pufferlösungen mit niedriger Konzentration monovalenter Kationen (150 mM; Tabelle 7, IIA, IIIA, IIIB) erreicht werden. Wenn das Myosin durch sehr hohe Konzentrationen monovalenter Kationen während der Gewebezerkleinerung ein zähflüssiges Gel bildet, kann wahrscheinlich ein Teil der Ribosomen und Polysomen auch durch intensive Homogenisation nicht mehr zwischen den aufgequollenen Myosinfibrillen herausgelöst werden. Wird dagegen während der Homogenisation durch niedrigere Konzentrationen monovalenter Kationen nur ein kleinerer Teil des Myosins in Lösung gebracht, so wirken sich die Homogenisationsvorgänge vermutlich intensiver aus: die Ablösung der Ribosomen und Polysomen vom Myosin ist effektiver, die Ausbeute steigt. Wird dem Extraktionspuffer Dithiotreitol zum Schutz der Sulfhydrylgruppen der Proteine zugesetzt (Tabelle 7, IIIA, IIIB; Rampersad et al., 1965), so steigt die Ausbeute ebenfalls. Intensive Homogenisation des Gewebes unter Verwendung von Ultraschall, frühe Ausfällung zumindest eines Teils des vorhandenen Myosins durch niedrigere Konzentrationen monovalenter Kationen und Schutz der Sulfhydrylgruppen der Proteine durch Dithiotreitol im Extraktionspuffer sind die Bedingungen für die höchste erreichte RNP-Ausbeute (Tabelle 7, IIIB). Diese Einflußgrößen verhalten sich offenbar additiv:

werden alle Bedingungen erfüllt, so ist die RNP-Ausbeute höher als bei einer Bedingung allein.

Ein einziges Verfahren erbrachte nur biologisch inaktive Ribonukleoproteinpartikel: das Pulverisieren des mit flüssigem Stickstoff gefrorenen Gewebes (Tabelle 7, IC). Dieses Verfahren wird zum Aufschluß bakteriellen Materials angewendet; Rannels et al. (1978) benutzten es, um in Eukaryonten-Zellen den Gehalt an Ribosomen und Polysomen zu bestimmen, ohne jedoch die biologische Aktivität derselben zu überprüfen.

Die Ausbeuten an biologisch aktiven Ribonukleoproteinpartikeln, die mit den Präparationsverfahren der Tabelle 3 erzielt wurden, betragen zwischen 43.5 und 720.8 µg/g FG und stimmen so mit den von anderen Autoren angegebenen Werten ungefähr überein. Insgesamt liegen die in der Literatur beschriebenen Ausbeuten an Ribosomen und Polysomen aus Skelettmuskelgewebe zwischen 53 µg/g FG (Bullock et al., 1968) und 750-1100 µg/g FG (Ionasescu et al., 1970). Die meisten Autoren geben jedoch Ausbeuten zwischen 100 µg und 200 µg/g FG an (Rampersad et al., 1965; Wool und Cavicchi, 1967; Castles und Wool, 1972). Bei der RNP-Isolierung aus Myokard (Earl und Morgan, 1968) und aus embryonalem Muskelgewebe (Heywood et al., 1968) werden - wahrscheinlich wegen der im Vergleich zum reifen Skelettmuskel ungleich höheren Proteinsyntheserate (Srivastava, 1968) - erheblich größere Ausbeuten erzielt (1240 bzw. 1142 µg/g FG).

Ein Zusammenhang zwischen der Konzentration monovalenter Kationen im Extraktionspuffer und der RNP-Ausbeute ist - wahrscheinlich wegen der Verschiedenheit der von den einzelnen Autoren verwendeten Präparationsverfahren - bei Durchsicht der Literatur nur annähernd erkennbar: sehr niedrige K^+-Konzentrationen um 80 mM führen meist zu niedri-

geren Ausbeuten um 80 µg/g FG (Breuer et al., 1964; Florini et al., 1966; Bullock et al., 1968), mittlere K^+-Konzentrationen von 100 bis 250 mM bewirken meist höhere Ausbeuten um 700 µg/g FG (Chen und Young, 1968; Ionasescu et al., 1970, 1971). Es gibt jedoch Ausnahmen, die auf den Einfluß der Homogenisation oder weiterer, hier nicht in Betracht gezogener Faktoren zurückzuführen sein mögen, wie z.B. die Art des verwendeten Detergens..- Insgesamt liegen die erzielten Ausbeuten also im Bereich der in der Literatur angegebenen Werte; das günstigste Präparationsverfahren (IIIB) liefert mit einer RNP-Ausbeute von 720 µg/g FG etwa dieselben Ergebnisse wie die effektivste in der Literatur angegebene Methode (Ionasescu et al., 1970).

4.1.2. t-RNS

Die t-RNS-Ausbeute hängt offensichtlich von denselben Bedingungen ab wie die RNP-Ausbeute - das beweist die signifikante Kovarianz zwischen beiden. Ein Vergleich aller Präparationsverfahren der t-RNS ergibt signifikante Unterschiede zwischen den mit den einzelnen Methoden erzielten Ausbeuten (Einzelvergleiche waren wegen zu geringer Meßwertanzahl nicht prüfbar). Auch bei der t-RNS-Präparation wird die größte Ausbeute mit Ultraschallhomogenisation, niedriger Konzentration monovalenter Kationen im Extraktionspuffer und Dithiotreitol zum Schutz der Sulfhydrylgruppen erzielt (Tabelle 7, IIIB). Der Verzicht auf die Entfernung von Zellkernen, Mitochondrien, Ribonukleoproteinpartikeln und Myosin durch Zentrifugation bei 12.000 und bei 100.000 x g vor der Phenolextraktion (Tabelle 8, IA) ergab zwar die zweithöchste Ausbeute, verminderte aber die Reinheit der t-RNS-Fraktion.

Zwischen der Reinheit der t-RNS-Präparation und der Ausbeute besteht keine signifikante Korrelation ($r = 0.178$).

In der Literatur ist bisher noch kein Versuch beschrieben, t-RNS aus Skelettmuskulatur oder aus anderem Muskelgewebe zu isolieren. Eine vergleichende Bewertung der von mir verwendeten Präparationstechniken und der mit ihnen erzielten Ausbeuten ist daher nicht möglich. Die t-RNS-Ausbeuten aus anderen eukaryotischen Zellen liegen zum Teil erheblich höher als bei der effektivsten von mir verwendeten Isolierungsmethode aus Skelettmuskulatur (Tabelle 7, IIIB: 102 µg/g FG; Neth et al., 1968: Tonsillen: 161-200 µg/g FG; Milz: 89-95 µg/g FG, Nebenniere: 100 µg/g FG, Tumorgewebe: 33-186 µg/g FG). Diese Mengendifferenzen könnten folgende Ursachen haben: (1) Die Isolierung von t-RNS aus Skelettmuskelgewebe ist aufwendiger und weniger ergiebig als die Präparation aus parenchymatösen Organen, d.h. die t-RNS-Verluste während des Präparationsganges dürften größer sein, da der Aufschluß des Muskelgewebes durch seinen Myosingehalt erschwert wird. (2) Die Proteinsyntheserate in der sehr langlebigen Skelettmuskelzelle ist erheblich niedriger als beispielsweise in der sehr aktiv am Stoffwechsel beteiligten Leber, in den lymphatischen Organen Milz und Tonsillen oder in wucherndem, d.h. in seinem Wachstum enthemmtem Tumorgewebe. Aufgrund der niedrigeren Proteinsyntheseaktivität ist also schon in vivo ein geringerer t-RNS-Gehalt der Skelettmuskelzelle zu erwarten.

4.2. Standardsysteme der zellfreien Proteinsynthese

Um die Proteinsynthese in zellfreien Systemen unter standardisierten Bedingungen durchführen zu können, muß zuvor die Abhängigkeit des Einbaus markierter Aminosäuren in säurefällbares Protein von den Versuchsbedingungen in den Testansätzen geprüft werden. Im folgenden soll der Zusammenhang zwischen der Variation verschiedener Einflußgrößen - Konzentrations- und Ionenverhältnisse, Inkubationszeit des Versuchsansatzes - und der Einbauaktivität im zellfreien System diskutiert werden.

Um die Versuchsbedingungen der Proteinsynthese in vitro denjenigen in vivo anzunähern, wurde in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal ausschließlich homologe (d.h. aus demselben Gewebe wie Ribosomen, Polysomen und Enzyme isolierte) t-RNS in den zellfreien Systemen aus Skelettmuskelgewebe verwendet. Bisher war in den Skelettmuskelsystemen ausnahmslos heterologe t-RNS eingesetzt worden, und auch beim Experimentieren mit Standardsystemen aus anderen Körpergeweben wurde selten homologe t-RNS benutzt (Neth et al., 1968). Verschiedene Untersuchungen deuten jedoch darauf hin, daß die Synthetasen (Aminoazyltransferasen) weitgehend Spezies-spezifisch sind, d.h. nur t-RNS aus demselben Gewebe aminoazylieren, heterologe t-RNS dagegen entweder gar nicht oder nur verlangsamt und in geringerem Maße akzeptieren (Hirsch und Strehler, 1973). Die Aminosäuren-Inkorporation ist jedoch auch abhängig von der Aminosäure: nur ganz wenige Aminosäuren werden von absolut Spezies-spezifischen Synthetasen auf die t-RNS übertragen (Doctor und Mudd, 1963). Offenbar gibt es auch Zellen, deren t-RNS allgemein nur eine geringe Spezies-Spezifität aufweist, so zum Beispiel t-RNS aus Escherichia coli (Jacobson, 1971). Unter Umständen

kann aber die Aminosäuren-Inkorporation in einem System mit heterologer t-RNS noch niedriger sein als in einem System ohne exogen zugeführte t-RNS (Goertz et al., 1972). Die - wie bisher meist üblich - mit heterologer t-RNS gemessene biologische Aktivität eines zellfreien Systems entspricht also möglicherweise nicht der Proteinsynthese in der lebenden Zelle und erlaubt in diesem Falle auch keine Aussage darüber.

Neben den Einzelkomponenten des proteinsynthetisierenden Apparats - Ribosomen, Polysomen, t-RNS und Enzyme - sowie Aminosäuren als Substrat der Proteinsynthese enthalten die zellfreien Systeme jeweils monovalente und divalente Kationen, energiereiche Phosphate und ein energieregenerierendes Enzymsystem. Ein monovalentes Kation ist notwendig für die Peptidyltransferase-Reaktion während der Elongationsphase der Proteinsynthese (Maden, 1968). Die optimalen Konzentrationen liegen für K^+ und NH_4^+ , die austauschbar sind, zwischen 50 und 150 mM (Castles und Wool, 1972). Einige Autoren beschreiben einen zusätzlichen Steigerungseffekt des NH_4^+ auf die Proteinsynthese (Lubin, 1963; Florini, 1964), andere konnten diesen Effekt nicht nachweisen (Earl und Morgan, 1968). Zudem sind für die strukturelle Integrität der Ribosomen und für die Bindung der m-RNS und der Aminoazyl-t-RNS an dieselben die divalenten Mg^{2+}-Ionen notwendig. Das Optimum der Mg^{2+}-Konzentration variiert mit der Konzentration der vorhandenen Nukleosidtriphosphate, die mit den Mg^{2+}-Ionen Chelatkomplexe bilden und ihre effektive Konzentration auf diese Weise senken (Castles und Wool, 1972). Die Nukleosidtriphosphate ATP, CTP und GTP sind als Energieträger im zellfreien proteinsynthetisierenden System erforderlich: ATP wirkt stimulierend auf die Proteinsynthese (Castles und Wool, 1972), GTP wird für Initiation, Bindung der Aminoazyl-t-RNS und Translokation gebraucht. Ferner enthalten die Ver-

suchsansätze ein energieregenerierendes Enzymsystem, zum Beispiel Phosphoenolpyruvat/Pyruvatkinase oder die in der vorliegenden Arbeit überwiegend verwendete Kombination Kreatinphosphat/Kreatinphosphokinase, die - zumindest im Retikulozytensystem - der erstgenannten überlegen sein soll (Adamson,et al., 1968). Bei der Umwandlung von einem Molekül Kreatinphosphat in Kreatin durch die Kreatinphosphokinase oder von einem Molekül Phosphoenolpyruvat in Pyruvat durch die Pyruvatkinase entsteht jeweils ein Molekül ATP aus ADP.

Ein quantitativer Vergleich der biologischen Aktivität meiner zellfreien Systeme mit den in der Literatur angegebenen Werten (z.B. in cpm oder dpm) ist wegen der Verschiedenheit der jeweils verwendeten radioaktiv markierten Aminosäuren (spezifische Aktivität, Konzentration) schwierig. Ich werde mich daher auf die qualitative Beschreibung der Kurven beschränken, die die Abhängigkeit der biologischen Aktivität von der Variation jeweils eines Parameters darstellen, und deren Verlauf mit den Experimenten anderer Autoren vergleichen.

4.2.1. Polysomale Systeme

Die zellfreie Proteinsynthese in polysomalen Muskelsystemen dauert bei Inkubation der Testansätze bei 37°C mindestens 85 Minuten (Versuchsende). Bis ca. 55 Minuten Inkubationszeit steigt die Synthese linear, danach flacht sie sich nur geringfügig ab. Ein Sistieren der Synthese nach 20 bis 25 Minuten (Wool und Cavicchi, 1967; Bester und Gevers, 1973) war nicht zu beobachten. Übereinstimmend mit meinen Ergebnissen wurde von anderen Autoren eine Linearität des Syntheseanstiegs auch über längere Inkubationszeiten be-

schrieben (Breuer et al., 1964: bis 60 Minuten; Chen und Young, 1968: 40 bis 60 Minuten; Earl und Morgan, 1968: bis 60 Minuten; Heywood et al., 1968: je nach verwendeter Enzymfraktion bis 60 oder bis 90 Minuten). Die Beendigung der Proteinsynthese nach maximal 90 Minuten wäre erklärbar durch den fortschreitenden Verbrauch von für die Proteinsynthese essentiellen Faktoren, wie beispielsweise Aminosäuren oder energiereiche Phosphate. Der Zeitpunkt der Beendigung der Proteinsynthese wäre dann unter anderem abhängig von der unterschiedlichen Konzentration potentiell limitierender Faktoren im Versuchsansatz. Diese Überlegung könnte die unterschiedlichen Meßwerte für den Endpunkt der Proteinsynthese in polysomalen Muskelsystemen erklären.

Eine Proportionalität zwischen Proteinsynthese und Polysomenkonzentration konnte ich bis zu einer Polysomenkonzentration von 1 g/ml beobachten, was mit den Ergebnissen von Heywood et al. (1968) annähernd übereinstimmt (Proportionalität bis 800 mg Polysomen pro ml). Andere Autoren beschreiben niedrigere Polysomenkonzentrationen als Grenze der Proportionalität (Wool und Cavicchi, 1967: 200 mg/ml; Castles und Wool, 1972: 60 mg/ml; Chen und Young, 1968: 100-600 mg/ml). Die Ursache mag wieder, wie oben für den Zeitablauf der Reaktion ausgeführt, im vorzeitigen Verbrauch von für die Proteinsynthese notwendigen Faktoren liegen.

Auch das Optimum der Enzymkonzentration von etwa 600 µg Enzymprotein/ml bzw. dem 1.5fachen der Polysomenmenge entspricht ungefähr den Ergebnissen anderer Autoren (Heywood et al., 1968: 400 bis 500 µg/ml je nach verwendeter Enzymfraktion).

Das gleiche gilt für das Optimum der Mg^{2+}-Ionen-Konzentration bei 12 mM (Castles und Wool, 1972; Florini, 1964; Rampersad et al., 1965; Chen und Young, 1968; Cooper et al., 1968).

4.2.2. Ribosomale Systeme

Die Kurve der Poly-U-abhängigen Poly-Phenylalanin-synthese steigt mit der Inkubationszeit bis etwa 25 Minuten steil, dann immer flacher an, um sich asymptotisch einem Plateau anzunähern. Nach 120 Minuten (Versuchsende) ist immer noch ein leichter Anstieg festzustellen. Einen insgesamt verkürzten zeitlichen Ablauf beschreiben Castles und Wool (1972): steiler Anstieg bis 5 Minuten, Sistieren der Poly-Phenylalaninsynthese nach 20 Minuten. Das schnelle Erreichen der Maximalsynthese und die frühe Beendigung beruhen vermutlich, wie oben für die polysomalen Systeme diskutiert, auf dem vorzeitigen Verbrauch eines für die Synthese essentiellen Faktors.

Die Poly-Phenylalanin-Synthese ist der Ribosomenmenge bis zur höchsten untersuchten Konzentration von 0.4 mg/ml proportional. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Autoren (Wool und Cavicchi, 1967: 0.2 mg/ml; Castles und Wool, 1972: 0.02 mg/ml; Alexis et al., 1972: 0.1 mg/ml). Möglicherweise wirkte auch hier eine andere Komponente des Systems limitierend.

Das Optimum der Enzymkonzentration liegt mit 0.6 mg/ml niedriger als von Wool und Cavicchi (1967) und Castles und Wool (1972) angegeben. Dies mag auf den unterschiedlichen Reinheits- und Konzentrationsgrad der verwendeten Enzympräparationen zurückzuführen sein: die genannten Autoren benutzten die S-100-Fraktion, während in der vorliegenden Arbeit ein gereinigtes Konzentrat derselben, die AS-70-Fraktion, verwendet wurde.

Die Proteinsynthese in ribosomalen Systemen steigt linear mit der Konzentration homologer t-RNS bis zu einer Konzentration von 350 µg/ml an und sinkt dann

wieder. Vergleichbare Daten in der Literatur existieren nicht, da bisher nur heterologe t-RNS aus Escherichia coli verwendet wurde. Wool und Cavicchi (1967) erreichten eine Sättigung des Systems mit E.coli-t-RNS erst bei einem Konzentrationsverhältnis von t-RNS : Ribosomen wie 8 : 1, während mit homologer t-RNS die Sättigung mit einem Konzentrationsverhältnis von 1.75 : 1 erreicht wird. Das legt die Vermutung nahe; daß die heterologe t-RNS nur einen Bruchteil der biologischen Aktivität der homologen t-RNS entfaltet. Es ist auch nicht auszuschließen, daß sie darüber hinaus zu Störungen und Translationsfehlern während der Proteinsynthese führt (s. 4.2.).

Das Optimum der Mg^{2+}-Ionen-Konzentration bei 15-20 mM wird auch von Wool und Cavicchi (1967) und Castles und Wool (1972) beschrieben.

4.2.3. Systeme der Aminoazylierung der t-RNS

Jedes t-RNS-Molekül bindet spezifisch nur eine Aminosäure, einige Aminosäuren dagegen werden von mehreren verschiedenen t-RNS-Molekülarten gebunden ('Isoakzeptor-t-RNS'). Die verschiedenen Skelettmuskel-t-RNS-Spezies können noch nicht einzeln isoliert und deshalb auch nicht gesondert untersucht werden. Darum wird der unaufgetrennten t-RNS-Fraktion jeweils eine Aminosäure zugesetzt, die von den für sie spezifischen t-RNS-Molekülen gebunden wird. Dieser Versuch müßte für alle 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren durchgeführt werden. Wegen des sehr großen Aufwandes wurde hier nur die Aminoazylierung von je 2 t-RNS-Spezies miteinander verglichen. Schon dabei stellt sich heraus, daß bei völlig gleichen Versuchsbedingungen für die $t\text{-RNS}^{Lys}$ durchgängig höhere Werte

gemessen werden als für die t-RNS^{Met} und für die t-RNS^{Phe}. Diese Beobachtung wäre erklärbar durch die Annahme, daß in der Muskelzelle innerhalb des t-RNS-Pools die t-RNS^{Lys} besonders häufig vorhanden ist, möglicherweise, weil die in der Muskelzelle synthetisierten Proteine diese Aminosäure in überdurchschnittlicher Menge enthalten: vor allem das Kollagen enthält große Mengen Hydroxylysin, das als Lysin in die Peptidkette eingebaut und erst später hydroxyliert wird. Wichtig ist aber, festzuhalten, daß die untersuchten t-RNS-Spezies sich qualitativ gleich verhalten: ihre Beladungskurven verlaufen annähernd parallel.

Untersuchungen der Aminoazylierung sind bisher noch nicht an Skelettmuskel-t-RNS durchgeführt worden. Bei der Untersuchung von t-RNS aus anderen Geweben ergaben sich vergleichbare Beobachtungen über den Zeitablauf der Aminoazylierung: während die Aminoazylierung der Skelettmuskel-t-RNS ein breites Maximum nach 16 (t-RNS^{Phe}) bzw. nach 18 Minuten Inkubationszeit (t-RNS^{Lys}) hat, steigt die Aminoazylierung bei Tonsillen-t-RNS bis 20 Minuten an (Neth et al., 1968).

Bei Skelettmuskel-t-RNS steigt die Aminoazylierung monoton mit der t-RNS-Konzentration bis 580 µg/ml an. Höhere t-RNS-Konzentrationen steigern die Reaktion nicht weiter. Vergleichbare Untersuchungen anderer Autoren sind mir nicht bekannt.

Die optimale Enzymkonzentration in Systemen der Aminoazylierung der Skelettmuskel-t-RNS (4.3 mg/ml) liegt nur annähernd in der Größenordnung der Enzymoptima für Milz-t-RNS (1 mg/ml) und Tonsillen-t-RNS (3 mg/ml; Neth et al., 1968).

Die Untersuchung der Aminoazylierung bei unterschiedlichen Konzentrationen von Mg^{2+}-Ionen, ATP und CTP wurde durchgeführt, da die optimale Aminoazyl-AMP-Bindung vom Mg^{2+}/ATP-Quotienten im Inkubations-

medium abhängig ist (Christopher et al., 1971; Tao und Hall, 1971; Yarus und Rashbaum, 1972). ATP-Konzentrationen unter 1 mM und Mg^{2+}Ionen-Konzentrationen unter 10 mM senken die biologische Aktivität. Optimal sind Konzentrationen von 10 mM Mg^{2+}, 1-2 mM ATP und 0.1-0.2 mM CTP entsprechend einem Konzentrationsverhältnis von Mg^{2+} : ATP : CTP wie 100 : 10 : 1 oder 50 : 10 : 1. Auch hier fehlen direkt vergleichbare Werte in der Literatur.

4.2.4. Systeme mit Postmitochondrialer Überstandsfraktion (S-12)

Für eine Standardisierung der zellfreien proteinsynthetisierenden Systeme zu diagnostischen Zwecken sind die Systame mit postmitochondrialer Überstandsfraktion (S-12-Systeme) ganz besonders geeignet, da sie aus sehr geringen Materialmengen (0.5 bis 1.0 g, z.B. aus Biopsien) sehr schnell und einfach herstellbar sind. S-12-Systeme enthalten alle Komponenten des proteinsynthetisierenden Apparats - Polysomen, t-RNS und Enzyme - in Konzentrationsverhältnissen, die denen in vivo weitgehend entsprechen. Das sind dieselben Bestandteile wie in den polysomalen Systemen. Man kann deshalb davon ausgehen, daß in S-12-Systemen dieselben Schritte der Proteinsynthese ablaufen und daß diese von denselben Einflußgrößen abhängen wie im polysomalen System.

Der Nachteil der S-12-Systeme besteht in den vorgegebenen Konzentrationsverhältnissen der Einzelkomponenten des proteinsynthetisierenden Apparats; eine selektive Untersuchung der Abhängigkeit der Proteinsynthese von einzelnen Faktoren ist mit den S-12-Systemen nicht möglich.

Untersucht wurde die Abhängigkeit der biologischen Aktivität des S-12-Systems (1.) von der Präparationsmethode der S-12-Fraktion, (2.) von der zusätzlichen Zugabe homologer und heterologer t-RNS, (3.) von der Inkubationszeit der Versuchsansätze.

Zu (1.): Bei der Präparation der S-12-Fraktion sollte das Myosin der Muskelzellen durch hohe K^+-Konzentrationen in Lösung gehalten und in der Fraktion belassen werden, um keine Polysomen mit dem ausfallenden Myosin zu verlieren. Wird das Myosin ausgefällt, sinkt die biologische Aktivität der S-12-Fraktion um ein Drittel.

Zu (2.): Die Verwendung von zusätzlicher homologer t-RNS steigert die biologische Aktivität, woraus zu schließen ist, daß die im S-12-System enthaltene 'endogene' t-RNS die Menge der in vitro synthetisierten Proteine limitiert. Bei Verarbeitung sehr kleiner Materialmengen (z.B. Biopsate) wird nur selten homologe t-RNS zusätzlich isoliert werden können. Heterologe t-RNS, z.B. aus Kalbsleber oder Escherichia coli, steigert die biologische Aktivität des Systems ebenfalls, wenn auch in viel geringerem Maße. Aber es ist nicht auszuschließen, daß die so gemessenen Werte der biologischen Aktivität keine Aussage über die Proteinsynthese in vivo gestatten (s. 4.2.).

Zu (3.): Die Kinetik des Einbaus markierter Aminosäuren in den S-12-Systemen entspricht etwa der der polysomalen Systeme: die Synthese steigt bis mindestens 90 Minuten Reaktionsdauer an (Versuchsende), der Anstieg verlangsamt sich nach ca. 60 Minuten. Das entspricht auch den Ergebnissen von Schreiber et al. (1967) und Earl und Korner (1968).

4.2.5. Enzyme

Homologe Enzymfraktionen wurden präpariert, weil die t-RNS in der Regel nur von homologen Synthetasen aminoazyliert wird (s. 4.2.). Die präparierten Enzymfraktionen wurden auf ihren Proteingehalt untersucht, die Ausbeute aus dem Gewebe wurde bestimmt und die Aktivität im t-RNS-System gemessen. Die Enzymfraktionen unterscheiden sich durch die Anreicherungsschritte während des Präparationsganges: aus der S-100-Fraktion wurden durch Präzipitation der Proteine und Konzentration die pH-5- und die AS-70-Fraktion hergestellt. Wie die geringe Differenz der Ausbeuten zeigt (20 gegenüber 19 mg/g FG), ist die Konzentration der chromatographierten S-100-Fraktion der der unbehandelten Fraktion annähernd gleich.

Die unterschiedliche Aktivität der Enzymfraktionen im t-RNS-System dürfte auf ein unterschiedliches Enzymmuster zurückzuführen sein. Wahrscheinlich ist der Anteil der für die Proteinsynthese essentiellen Enzyme am Gesamtproteingehalt der Enzymfraktion in den wenig gereinigten Fraktionen (S-100-Fraktion roh) niedriger als in den konzentrierten (pH-5- und AS-70-Fraktion). Dies mag ein wesentlicher Grund dafür sein, daß die AS-70-Fraktion die biologische Aktivität des t-RNS-Standardsystems am meisten steigerte. Unklar ist dagegen die Ursache für die geringe Wirksamkeit der ebenfalls stark gereinigten pH-5-Fraktion.
Die AS-70-Fraktion ist bei einer Temperatur von $-80^{\circ}C$ ohne erkennbaren Aktivitätsverlust mindestens ein Jahr haltbar, so daß sie sich wegen ihrer biologischen Wirksamkeit und ihrer Stabilität als Enzymfraktion für alle Standardsysteme ganz besonders eignete.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Verfahren zur Isolierung der einzelnen Komponenten des proteinsynthetisierenden Apparats aus dem Skelettmuskel des Kaninchens untersucht. Zur Präparation der Messenger-Ribosomen-Komplexe und Ribosomen erwies sich als besonders günstig ein Verfahren, in dem die Ribonukleoproteinpartikel durch Ultraschall-Homogenisation vom Myosin getrennt und die Sulfhydrylgruppen durch Dithiotreitol im Extraktionspuffer geschützt wurden, bevor die Reinigung der Ribonukleoproteinpartikel über diskontinuierliche Saccharose-Gradienten erfolgte. Die t-RNS wurde durch kalte Phenolextraktion aus den postmikrosomalen Überständen gewonnen; zur Vermeidung einer Degradation der Ribonukleinsäure wurde dieses Verfahren mit einer SDS-Proteinase K-Behandlung kombiniert. Als günstigste Enzymfraktion für die in vitro-Synthese der Muskeleiweiße erwiesen sich die durch fraktionierte Aussalzung mit Ammoniumsulfat gewonnenen AS-70-Enzyme. Die Ausbeuten der Einzelkomponenten des zytoplasmatischen proteinsynthetisierenden Apparats aus dem Gewebe wurden spektrometrisch anhand der UV-Absorption der Nukleinsäuren gemessen. Die biologischen Aktivitäten wurden in zellfreien Systemen gemessen. Für polysomale und ribosomale Standardsysteme der zellfreien Proteinsynthese, Systeme der Aminoazylierung der t-RNS und für Systeme mit postmitochondrialer Überstandsfraktion wurden die günstigsten Ionen- und Energiebedingungen sowie die geeignetsten Konzentrationen der einzelnen Komponenten bestimmt.

Anhang A Ablauf der Proteinbiosynthese in Eukaryonten

Die grundlegenden Erkenntnisse über den Mechanismus der Proteinbiosynthese wurden durch Untersuchungen an Bakterien gewonnen (Nirenberg und Matthaei, 1961; Nirenberg, 1968). Die aufgrund dieser Untersuchungen entwickelten Vorstellungen lassen sich aber im wesentlichen auf die Zellen aller Organismen übertragen (Wittmann, 1974; Wool und Stöffler, 1974).

Träger der genetischen Information ist in allen Zellen die Desoxyribonukleinsäure (DNS). Die genetische Information wird gemäß dem Triplett-Code (Crick et al., 1961; Nirenberg und Matthaei, 1961; Crick, 1966; Watson, 1968) auf die m-RNS übertragen (Transskription). Die m-RNS verbindet sich mit Proteinen zum Informosom und wandert ins Zytoplasma, wo sie mit Ribosomen zusammentritt. Die zytoplasmatische Proteinsynthese an m-RNS und Ribosomen wird als Translation bezeichnet (Ochoa, 1968). Dabei wirkt die t-RNS als Adapter, da sie Bindungsstellen für je ein Triplett der m-RNS (Anticodon), für die davon codierte Aminosäure sowie für eine Aminoazyltransferase (Synthetase) besitzt, die die Übertragung der codierten Aminosäure auf das t-RNS-Molekül spezifisch katalysiert. Für jede der 20 Aminosäuren existieren eine spezifische t-RNS und eine spezifische Aminoazyltransferase (Letham, 1973; Kan und Sueoka, 1971).
Im Ablauf der Translation unterscheidet man folgende Einzelschritte:

Initiation

Zu Beginn der Translation wird der Initiationskomplex gebildet, indem die beiden Untereinheiten des dissoziert vorliegenden Ribosoms mit dem Startcodon der m-RNS und dem Methionin-spezifischen Initiator-t-RNS-

Molekül t-RNS$^{Met}_{f}$ zusammentreten. Dazu müssen spezifische Proteine, sogenannte Initiationsfaktoren, anwesend sein, von denen man in Eukaryonten bisher 7 Arten isoliert hat.

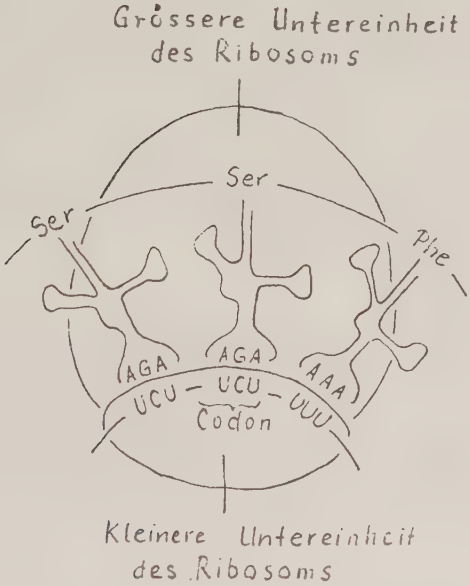

Abb. 14 Schematische Darstellung der Elongationsphase (modifiziert nach Kanig, 1973).
Ser = Serin, Phe = Phenylalanin, A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, U = Uracil.

Elongation

Das Ribosom (s. Abbildung 14) besitzt neben einer m-RNS-Bindungsregion zwei t-RNS-Bindungsstellen, die als Eingang und Ausgang bezeichnet werden. Sobald am Ausgang die t-RNS$^{Met}_{f}$ fixiert ist, wird im Eingang enzymatisch die nächste codierte Aminoazyl-t-RNS gebunden. Zwischen beiden Aminosäuren wird enzymatisch eine Peptidbindung geknüpft, und die Peptidkette wird unter Einwirkung sogenannter Transferfaktoren zum Ausgang verschoben. Zugleich rückt das Ribosom relativ zur m-RNS um ein Codon vor, die 'entladene' t-RNS verläßt das Ribosom, und am Eingang wird die nächste Aminoazyl-t-RNS gebunden. Ein m-RNS-Molekül kann gleichzeitig von mehreren Ribosomen in jeweils eine Peptidkette übersetzt werden. Die Funktionseinheit aus einem m-RNS-Molekül und mehreren Ribosomen wird Polysom genannt.

Termination

Die Translation wird durch einen spezifischen Terminationscodon auf der m-RNS beendet, an den sich ein spezifisches Protein, ein sogenannter Terminationsfaktor, direkt bindet und die Polypeptidkette enzymatisch freisetzt. Zugleich dissoziiert das Ribosom wieder in 2 Untereinheiten.

6. Literatur

Adamson, S.D., Godchaux, W. and E. Herbert:

Factors Affecting the Rate of Protein Synthesis in Lysate Systems from Reticulocytes.

Arch. Biochem. Biophys. 125 671 (1968)

Alexis, S.D. and V.R. Young:

Dietary Protein Intake and Skeletal Muscle Metabolism in Rats. Studies with the Ammonium-Chloride Wash-Fraction from crude Polyribosomes of well-nourished and Protein-depleted Rats.

Biochem. J. 136 773 (1973)

Avital, S. and D. Elson:

A Convenient Procedure for Preparing Transfer Ribonucleic Acid from Escherichia coli.

Biochim. Biophys. Acta 179 297 (1969)

Bank, A.:

The Thalassemia Syndromes.

Blood 51 369 (1978)

Bank, A. and F. Ramirez:

The molecular Biology of the Thalassemia Syndromes.

CRC Critical Reviews in Biochemistry 5 343 (1978)

Baker, R.D.:

Uptake of α-amino-isobutyric acid by Muscle of normal and dystrophic Mice.

Tex. Rep. Biol. Med. 22 Suppl.1 880 (1964)

Bester, A.J. and W. Gevers:

Cell-free Protein Synthesis in Heart and Skeletal Muscle from Polymyopathic Hamsters.

Biochem. J. 132 193 (1973)

Breuer, C.B., Davies, M.C. and J.R. Florini:

Amino Acid Incorporation into Protein by Cell-free Preparations from Rat Skeletal Muscle. II. Preparation and Properties of Muscle Ribosomes and Polyribosomes.

Biochemistry 3 1713 (1964)

Brimacombe, R., Stöffler, G. and H.G. Wittmann:

Ribosome Structure.

Ann. Rev. Biochem. 47 217 (1978)

Bullock, G., White, A.M. and J. Worthington:

The Effects of Catabolic and Anabolic Steroids on Amino Acid Incorporation by Skeletal Muscle Ribosomes.

Biochem. J. 108 417 (1968)

Castles, J.J. and I.G. Wool:

In: Protein Biosynthesis in Nonbacterial Systems. Ed. J.A. Last and A.J. Laskin. Dekker, New York, Chapter I, p.1 ff. (1972)

Chen, S. and V.R. Young:

Preparation and some Properties of Rat Skeletal Muscle Polyribosomes.

Biochem. J. 106 61 (1968)

Christopher, C.W., Jones, M.E. and D.W. Stafford:

Phenylalanine synthetase from Drosophila melanogaster. I. L-phenylalanine acivation optima for pH, temperature and Mg^{2+} estimation of molecular weight.

Biochim. Biophys. Acta 228 682 (1971)

Cooper, W.K., Muramatsu, K. and R.W. Wannemacher Jr.:

An in vitro amino acid incorporation system for liver, brain and skeletal muscle ribosomes.

Biochim. Biophys. Acta 169 269 (1968)

Crick, F.H.C., Barnett, L., Brenner, S. and R.J. Watts-Tobin:

General Nature of the genetic Code for Proteins.

Nature 192 1227 (1961)

Crick, F.H.C.:

The genetic Code.

Sc. Am. 215 55 (1966)

Dowben, R.M., Gaffey, T.A. and P.M. Lynch:

Isolation of Liver and Muscle Polyribosomes in High Yield after Cell Disruption by Nitrogen Cavitation.

FEBS Letters 2 1 (1969)

Earl, D.C.N. and A. Korner:

The Isolation and Properties of Cardiac Ribosomes and Polysomes.

Biochem. J. 94 721 (1965)

Earl, D.C.N. and H.E. Morgan:

An Improved Preparation of Ribosomes and Polysomes from Cardiac Muscle.

Archs. Biochem. Biophys. 128 460 (1968)

Falvey, A.K. and T. Staehelin:

Structure and Function of Mammalian Ribosomes.

J. Mol. Biol. 53 1 (1970)

Florini, J.R.:

Amino Acid Incorporation into Protein by Cell-free Preparations from Rat Skeletal Muscle. I. Properties of the Muscle Microsomal System.

Biochemistry 3 209 (1964)

Florini, J.R. and C.B. Breuer:

Amino Acid Incorporation into Protein by Cell-free Preparations from Rat Skeletal Muscle. V. Effects of Pituitary Growth Hormone on Activity of Ribosomes and Ribonucleic Acid Polymerase in Hypophysectomized Rats.

Biochemistry 5 (№ 6) 1870 (1966)

Forget, B.G.:

Molecular Genetics of Human Hemoglobin Synthesis.

Ann. Intern. Med. 91 605 (1979)

Godin, C., Kruh, J. and J.C. Dreyfus:

Reconstituted Reticulocyte Ribosomes active in Hemoglobin Synthesis.

Biochim. Biophys. Acta 182 175 (1969)

Goertz, B., Emmerich, B. and W. Kersten:

Effect of Chlorpromazine on Cell-free protein synthesizing Systems of Rat Brain, Rat Liver and E. coli.

Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353 793 (1972)

Gross-Bellard, M., Oudet, P. and P. Chambon:

Isolation of High Molecular Weight DNA from Mammalian Cells.

Eur. J. Biochem. 36 32 (1973)

Hehlmann, R.:

Die Thalassämien - Klinik und genetische Basis.

Deutsches Ärzteblatt 48 2841 (1980)

Heywood, S.M., Dowben, R.M. and A. Rich:

A Study of Muscle Polyribosomes and The Co-precipitation of Polyribosomes with Myosin.

Biochemistry 7 (No 9) 3289 (1968)

Hilz, H., Wiegers, U. and P. Adamietz:

Stimulation of Proteinase K Action by Denaturing Agents: Application to the Isolation of Nucleic Acids and the Degradation of 'Masked' Proteins.

Eur. J. Biochem. 56 103 (1975)

Hirsch, G.P.M. and B.L. Strehler:

Cross-Tissue Translational Capacities. I. The Adequacy of t-RNAs from heterologous Tissues in the Translation of Hemoglobin Message.

In: Mechanisms of Aging and Development, Vol. 2, Elsevier Sequoia S.A., Lausanne. 229 (1973)

Ioñasescu, V., Zellweger, H., Filer, L.J. and T.W. Conway:

Increased Collagen Synthesis in Arthrogryposis Multiplex Congenita.

Arch. Neurol. 23 128 (1970)

Ionasescu, V., Zellweger, H., Shirk, P. and T.W.Conway:

Identification of Carriers of Duchenne Muscular Dystrophy by Muscle Protein Syntheses.

Neurology (Minneapolis) 23 497 (1973)

Ionasescu, V., Zellweger, H., Ionasescu, R. and C. Lara-Braud:

Protein Synthesis in Human Muscular Dystrophies.

In: Pathogenesis of Human Muscular Dystrophies. Proceedings of the Rifth Scientific Conference of the Muscular Dystrophy Association. Ed. L.P. Rowland. p. 362 (1976)

Jacobson, K.B.:

Role of an Isoacceptor Transfer Ribonucleic Acid as an Enzyme Inhibitor: Effect of Tryptophane pyrrolase of Drosophila.

Nature New.Biol. 231 17 (1971)

Kan, J. and N. Sueoka:

Further Evidence for a single Leucin transfer Ribonucleic Acid Synthetase capable of Charging Five Leucin transfer Ribonucleic Acids in Escherichia coli.

J. Biol. Chem. 246 2207 (1971)

Kanig, K.:

Einführung in die Neurochemie.

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1973)

Korner, A.:

Studies on Incorporation of Amino Acids into Protein in isolated Rat-Liver Ribosomes.

Biochem. J. 81 168 (1961)

Kruh, J., Dreyfus, J.C., Schapira, G. and G.O. Gey:

Abnormalities in Muscle Protein Metabolism in Mice with Muscular Dystrophy.

J. Clin. Invest. 39 1180 (1960)

Lienert, G.A.:

Verteilungsfreie Methoden in der Biostatistik.

Bd. 1, Verlag Anton Hain, Meisenheim am Glan. Kap. 7.1, Kap. 9.7 (1973)

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and R.J. Randall:

Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent.

J. Biol. Chem. 193 265 (1951)

Lubin, M. and H.L. Ennis:

On the Role of Intracellular Potassium in Protein Synthesis.

Biochim. Biophys. Acta 80 614 (1964)

Maden, B.E.H.

Ribosome formation in animal cells.

Nature 219 685 (1968)

Mans, R.J. and D. Novelli:

Measurement of the Incorporation of Radioactive Amino Acids into Protein by a Filter-Paper Disk Method.

Archs. Biochem. Biophys. 94 48 (1951)

Mathias, A.P., Williamson, R., Huxley, H.E. and S. Page:

Occurence and Function of Polysomes in Rabbit Reticulocytes.

J. Mol. Biol. 9 154 (1964)

Mendelsohn, S.L. and D.A. Young:

Inhibition of Ribonuclease: Efficacy of Sodium Dodecyl Sulfate, Diethyl Pyrocarbonate, Proteinase K, and Heparin Using a sensitive Ribonuclease Assay.

Biochim. Biophys. Acta 519 461 (1978)

Monckton, G. and T. Nihei:

Some biochemical Changes occuring in muscular Dystrophy and their possible genetical Significance.

Ann. N.Y. Acad. Sci. 138 239 (1966)

Munro, A.J., Jachson, R.J. and A. Korner:
Studies on the Nature of Polysomes.
Biochem. J. 92 289 (1968)

Neth, R., Heller, G. und H. Matthaei:
Präparation von Ribosomen, transfer-RNA und Aminoacyl-transfer-RNA-Synthetasen aus Operations- und Biopsiematerial.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 349 1514 (1968)

Nirenberg, M.W. and J.H. Matthaei:
The Dependence of Cell-free Protein Synthesis in E.coli upon naturally occurring or synthetic Polyribonucleotides.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 47 1588 (1961)

Nirenberg, M.:
The Genetic Code.
In: Nobel Lectures. Physiology and Medecine 1963-1970. American Elsevier, p. 372 ff. (1973)

Ochoa, S.:
Translation of the Genetic Message.
Naturwiss. 55 505 (1968)

Petermann, M.L.:
The Physical and Chemical Properties of Ribosomes.
Elsevier, New York, N.Y., p. 63 (1964)

Portzehl, H.:
Masse und Maße des L-Myosins.
Z. Naturforsch. 5B 75 (1950)

Rampersad, O.R., Zak, R., Rabinowitz, M., Wool, I.G., and L. DeSalle:
Isolation and Characterization of Ribonucleoprotein Particles from Heart Muscle.
Biochim. Biophys. Acta 108 95 (1965)

Rannels, D.E., Pegg, A.E., Rannels, S.R. and L.S. Jefferson:
Effect of Starvation on Initiation of Protein Synthesis in Skeletal Muscle and Heart.
Am. J. Physiol. 235(2)E 126 (1978)

Rushizky, G.W., Greco, A.E., Hartley, R.W. and H.A. Sober:

Concentration and Desalting of RNAses.

Biochim. Biophys. Res. Comm. 10 311 (1963)

Schreiber, S.S., Oratz, M. and M.A. Rothschild:

Effect of acute Overload on Protein Synthesis in Cardiac Muscle.Microsomes.

Am. J. Physiol. 213 (No 6) 1552 (1967)

Simon, E.J., Lessell, J.M., Gross, C.S. and S. Milhorat:

Amino Acid Incorporation into Muscle and Liver Proteins of Mice with Hereditary Muscular Dystrophy.

Fed. Proc. 17 311 (1958)

Simon, E.J., Gross, C.S. and J.M. Lessell:

Turnover of Liver and Muscle Proteins in Mice with Hereditary Muscular Dystrophy.

Archs. Biochem. Biophys. 96 41 (1962)

Srivastava, U.:

Biochemical Changes in Progressive Muscular Dystrophy. VIII. Protein Synthesis in Skeletal Muscle of Mouse as a Function of Muscular Dystrophy.

Archs. Biochem. Biophys. 135 236 (1969)

Srivastava, U.:

Polyribosome Concentration of Mouse Skeletal Muscle as a Function of Age.

Archs. Biochem. Biophys. 130 129 (1969)

Srivastava, U. and L. Berlinguet:

Biochemical Changes in Progressive Muscular Dystrophy. V. Incorporation of leucine-C-14 into Protein of various Tissues of normal and dystrophic Mice.

Archs. Biochem. Biophys. 114 320 (1966)

Sueoka, N. and T. Kano-Sueoka:

Transfer RNA and Cell Differentiation.

Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 10 23 (1970)

Szent-Györgyi, A.G., Cohen, C., and D.E. Philpott:

Light Meromyosin Fraction I: A Helical Molecule from Myosin.

J. Mol. Biol. 2 133 (1960)

Tao, K.C. and T.C. Hall:

Factors Controlling Aminoacyl transfer Ribonucleic Acid Synthesis in vitro by a Plant System.

Biochem. J. 121 495 (1971)

Watson, J.D.:

Molecular Biology of the Gene.

W.A. Benjamin, Menlo Park, Calif., USA. p. 483 ff (1968)

Wiegers, U. and H. Hilz:

A new Method Using 'Proteinase K' to prevent m-RNA Degradation during Isolation from HeLa Cells.

Biochim. Biophys. Res. Comm. 44 513 (1971)

Wittmann, H.G.:

In: Ribosomes. Ed. M. Nomura, A. Tissières, and P. Lengyel. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, N.Y., USA. p. 93 ff (1974)

Wool, I.G. and P. Cavicchi:

Protein Synthesis by Skeletal Muscle Ribosomes. Effect of Diabetes and Insulin.

Biochemistry 6 1231 (1967)

Wool, I.G. and G. Stöffler:

In: Ribosomes. Ed. M. Nomura, A. Tissières and P. Lengyel. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, N.Y., USA. p. 417 ff (1974)

Yarus, M. and S. Rashbaum:

Divalent Cations in transfer Ribonucleic Acid and Aminoacyl transfer Ribonucleic Acid Synthetase Function and Structure.

Biochemistry 11 2043 (1972)

Zomzely-Neurath, C.:

Cerebral Protein Synthesizing Systems.

In: Protein Synthesis in Nonbacterial Systems. Ed. J.A. Last and A.J. Laskin. Marcel Dekker, New York, N.Y., USA (1972)

Zomzely-Neurath, C., York, C. and B.W. Moore:

In vitro Synthesis of Two Brain-Specific Proteins (S-100 and 14-3-2) by Polyribosomes from Rat Brain.

Archs. Biochem. Biophys. 155 58 (1973)

Ich danke Herrn Prof. Dr. A. Hopf für die Überlassung des Themas und Herrn Priv. Doz. Dr. B. Goertz für seine Unterstützung während der Durchführung der Arbeit.

Lebenslauf

Am 30. September 1956 wurde ich als erstes Kind des kaufmännischen Angestellten Anton Mewald und seiner Ehefrau Lieselotte Mewald, geb. Luck, in Wuppertal-Elberfeld geboren.
Nach dem Besuch des neusprachlichen Gymnasiums 'Am Kothen' in Wuppertal-Barmen legte ich am 4. Juni 1975 das Abitur ab. Anschließend studierte ich Medizin an der Universität Düsseldorf. Dort legte ich am 31. August 1977 die ärztliche Vorprüfung ab. Die vorgeschriebene Famulatur leistete ich in der Neurologischen Universitätsklinik Düsseldorf ab. Seit dem 20. Oktober 1980 absolviere ich das Internatsjahr an den Universitätskliniken Düsseldorf.

Druck und Verarbeitung: copy shop, darmstadt, tel. 21353